



FACULTAD DE CIENCIAS

Transportadores lipídicos de nanopartículas para usos terapéuticos.

Lipid carriers of nanoparticles for therapeutic uses.

**Trabajo de Fin de Grado
para acceder al**

GRADO EN FÍSICA

Autor: Lucía Abascal Ceruti

Director: Rafael Valiente Barroso

Co-director: Carlos Renero Lecuna

Julio 2020

Índice

Lista de figuras	2
Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. Objetivos	4
1.2. Nanopartículas	4
1.3. Liposomas	6
1.4. Nanopartículas de oro	8
1.4.1. Fototermia	9
1.5. Nanomedicina	10
2. Método experimental	11
2.1. Síntesis de AuNPs	11
2.2. Síntesis de liposomas	13
2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión	14
2.4. Preparación y tinción de muestras TEM	15
2.5. Espectroscopía de absorción UV-Vis	16
2.6. Entorno de trabajo	20
3. Resultados	24
3.1. Caracterización de las AuNPs	24
3.2. Imágenes TEM	27
3.3. Caracterización de liposomas	35
4. Conclusiones	38
Bibliografía	40

Índice de figuras

1.	Tipos de funcionalización	4
2.	Distintas nanopartículas	5
3.	Liposoma	6
4.	Naturaleza anfifílica de los liposomas	7
5.	Disolución acuosa HAuCl_4	12
6.	Esquema de los pasos seguidos en la síntesis de los liposomas.	13
7.	Microscopio electrónico de transmisión	15
8.	Rejilla TEM	16
9.	Tinción para microscopía electrónica	17
10.	Esquema interior del espectrofotómetro Cary50	18
11.	RPS en función del diámetro del Plasmón	18
12.	Espectro de absorbancia	19
13.	Relación tamaño-color AuNPs	19
14.	Precursor de oro empleado en la síntesis de las AuNPs.	20
15.	Espectrofotómetro empleado en la obtención de los espectros de absorción.	20
16.	Botes utilizados para las síntesis de los liposomas.	21
17.	Distintos Eppendorf [®] utilizados a lo largo de los experimentos para la unión de liposomas con AuNPs.	21
18.	Mesa de trabajo donde se organizaban las síntesis y sus concentraciones.	22
19.	Componentes del TEM.	22
20.	Pantalla con la que se observaban los liposomas y los AuNPs.	23
21.	Absorción inicial AuNPs	24
22.	Imagen TEM e histograma de distribución de tamaños de las AuNPs	25
23.	Absorción final AuNPs	26
24.	1.Lipo-N	30
25.	1.Lipo-N 5-95	30
26.	2. Lipo-Cat	31
27.	2.Lipo-Cat 1-200	31
28.	9.LipoN. Imagen característica	32
29.	11.Lipo-N-SH (diluido)	33
30.	13.Lipo-N-SH y 14.Lipo-N-SH	33
31.	17.Lipo-N-SH	34
32.	Absorción liposomas solos	35
33.	De izquierda a derecha: Lipo-Cat, Lipo-N y Lipo-NSH.	36
34.	Absorción liposomas sintetizados antes de la unión con AuNPs	36
35.	Absorción liposomas sintetizados al mismo tiempo que la unión con AuNPs	37

Resumen

Con el avance de las tecnologías, aparece la posibilidad de aumentar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios de algunos fármacos empleados para el tratamiento de distintas patologías, en especial los quimioterápicos. La nanotecnología tiene un papel muy importante en estas mejoras debido a la existencia de una gran variedad de nanopartículas (NPs) que pueden encargarse de encapsular y transportar fármacos.

En este trabajo, se desarrolla un estudio sobre la utilización de nano-transportadores lipídicos que permitan encapsular y transportar NPs para realizar terapias. A modo de prueba de concepto, se han sintetizado NPs de oro de tamaño $\approx 29 \pm 5$ nm con el objeto de encapsularlos en liposomas de distinto tipo, de manera que puedan ser transportados al interior de células sin necesidad de funcionalizar las NPs. Se han utilizado tres tipos de liposomas distintos: aniónicos, catiónicos y aniónicos tiolados (Lipo-N, Lipo-Cat y Lipo-N-SH, respectivamente). Mediante técnicas como la microscopía electrónica de transmisión o la espectroscopía UV-Vis se han caracterizado y analizado las NPs y los liposomas para conseguir la combinación ideal para optimizar el transporte de las NPs.

Palabras clave: Liposomas, nanopartículas de oro (AuNPs), microscopio electrónico de transmisión (TEM), espectroscopía UV-Vis, síntesis.

Abstract

With the improvement of new technologies, it is possible to increase therapeutic efficiency while reducing the side effects from the drugs used for therapies to treat different diseases. Nanotechnology plays a very important role in these advances due to the great variety of nanoparticles that can encapsulate and transport drugs.

In this project, we perform a study on the use of lipid nano-carriers which allow encapsulating and transporting nanoparticles for therapy. Gold NPs, 29 ± 5 nm size, have been synthesized to encapsulate them by using different types of liposomes, so that they can be transported into cells without the need to functionalize the NPs. As a proof of concept, three different types of liposomes have been used: anionic, cationic and anionic thiolated (Lipo-N, Lipo-Cat and Lipo-N-SH, respectively). In order to achieve the best combination to transport different drugs, nanoparticles and liposomes will be characterized and analysed using techniques such as transmission electron microscopy or UV-Vis spectroscopy

Keywords: Liposomes, gold nanoparticles (AuNPs), transmission electron microscope (TEM), absorption spectroscopy UV-Vis, synthesis.

1. Introducción

1.1. Objetivos

El objetivo principal de este TFG es el diseño de un transportador lipídico de NPs para usos terapéuticos. Las NPs son el agente terapéutico y los liposomas son la vía para llevar las NPs al interior de las células, sin necesidad de funcionalizar las NPs una a una. De este modo se pueden internalizar en las células de forma más eficiente. Estos transportadores se pueden cargar con fármacos y lograr así un agente terapéutico combinado. Se utilizan nanopartículas de oro (AuNPs).

Para conseguir este objetivo se han llevado a cabo los siguientes experimentos (podemos considerarlos como objetivos secundarios):

- Síntesis de nanopartículas de oro mediante el método de Turkevich-Frens [1] y su caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y espectroscopía UV-Vis.
- Puesta a punto de la síntesis de liposomas de distinto tipo: aniónicos, catiónicos y aniónicos tiolados, en adelante Lipo-N, Lipo-Cat y Lipo-N-SH, respectivamente. Difieren entre sí en su composición y carga superficial.
- Estudio de la interacción entre las nanopartículas y los liposomas. Estos últimos pueden encapsular, ser rodeados o tener nanopartículas de oro en el interior de la bicapa lipídica (Figura 1).

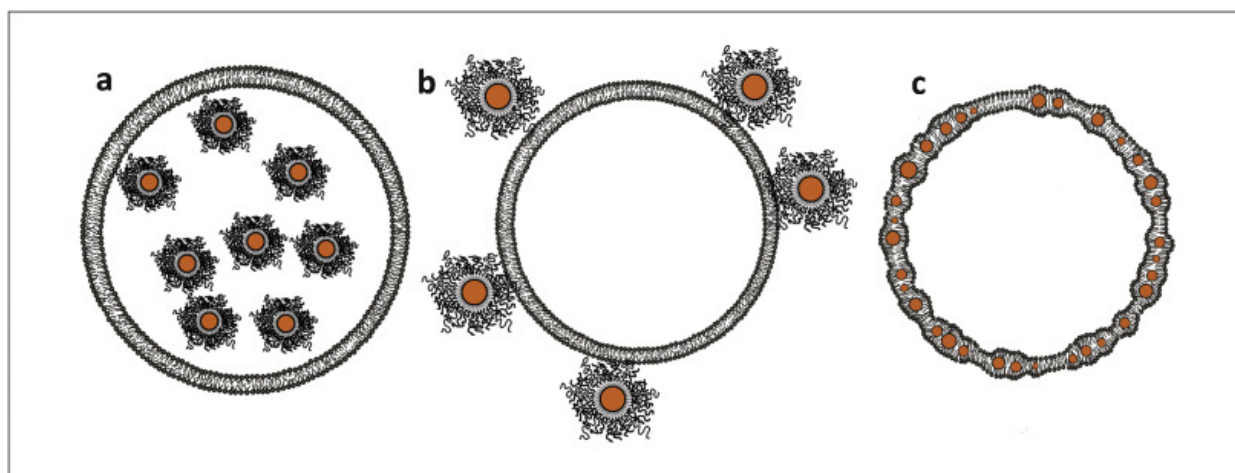


Figura 1: Liposomas con nanopartículas (esferas marrones) encapsuladas en a) parte acuosa, b) en la superficie externa o c) en el interior de la bicapa lipídica [2].

1.2. Nanopartículas

Existe una gran diversidad de NPs que pueden emplearse en distintos campos como la medicina, la catálisis, la electrónica o la cosmética, por citar algunos. Una posible forma de

clasificación de estas NPs puede ser en base a su composición química, como orgánicas o inorgánicas, destacando las siguientes:

- **Orgánicas:** formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno; tienen grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, anhídridos de ácido, amidas, nitrilos, aminas... Ejemplos: los nanotubos de carbono, los liposomas o los dendrímeros.
- **Inorgánicas:** formadas por distintos tipos de elementos como oxígeno, zinc, hierro, oro, plata, entre otros. Los grupos funcionales de las moléculas inorgánicas son: óxidos, hidróxidos, ácidos/bases, ácidos oxácidos, sales, peróxidos, hidruros. Ejemplos: los puntos cuánticos, las nanopartículas magnéticas, nanocables (nanowires), nanovarillas (nanorods).

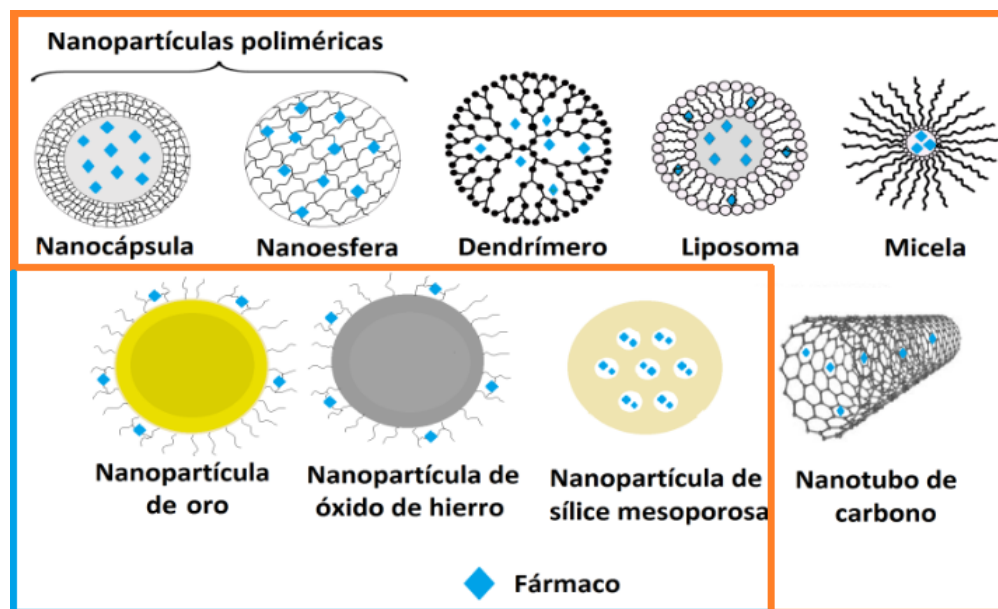


Figura 2: Representación de tipos de nanopartículas utilizados como sistemas de liberación.[3] Las recuadradas en naranja son orgánicas y en azul las inorgánicas.

Son muchas las características que definen a las nanopartículas: forma, tamaño, carga superficial, etc. El tamaño de las NPs y la distribución de tamaño pueden influir en la capacidad de carga y liberación de fármacos, también en el destino biológico (biodistribución) y la toxicidad [4]. La relación existente entre el área superficial y el volumen es mayor cuanto más pequeña es la partícula. Un inconveniente en comparación con las partículas más grandes es que las pequeñas tienen menor capacidad para llevar el fármaco en su interior [5]. Las propiedades superficiales son muy importantes, dependiendo de si son hidrofóbicas o hidrofílicas se puede utilizar una nanopartícula de una u otra forma. La hidrofobicidad, por ejemplo, determina los componentes de la sangre que se unen a su superficie [6]. Otra característica importante es la carga superficial caracterizada por el potencial zeta (potencial eléctrico de las partículas que depende de la composición de la partícula, el medio en el que se dispersa y su recubrimiento). Conociendo este potencial se puede determinar la estabilidad de las

NPs en suspensión o si el fármaco se ha encapsulado en el centro o en la superficie de la nanopartícula [7].

Aunque son muchos los tipos de NPs que se han estudiado desde el punto de vista básico buscando distintas aplicaciones, solamente unas pocas han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en humanos: liposomas y óxidos de hierro [7].

En los siguientes apartados se explicará con más detalle qué son los liposomas y cómo preparar las nanopartículas de oro y sus interacciones. Ambos son los sistemas empleados en este trabajo fin de grado.

1.3. Liposomas

El primer estudio sobre los liposomas viene de la mano de *Banghman et al.* (1965) en el Instituto Babraham, Universidad de Cambridge y desde entonces ha habido innumerables estudios relacionados con ellos y con sus aplicaciones. Los liposomas (Figura 3) son vesículas esféricas que están compuestas de bicapas lipídicas concéntricas (simples o múltiples) que encapsulan un compartimento acuoso en su núcleo. Permiten adsorber y transportar sustancias hidrosolubles (en su interior) y liposolubles (en la intercapa lipídica).

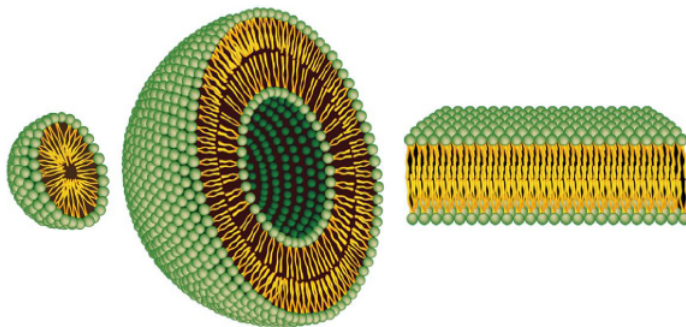


Figura 3: Representación esquemática de la organización de una micela (izquierda), un liposoma (centro) y una bicapa lipídica (derecha). [8]

En los últimos años, el interés por la utilización de estas estructuras como sistemas de transporte va en aumento, desde el ambiente farmacéutico al cosmético. Actualmente se considera como el mejor portador de fármacos gracias a su biodegradabilidad y su nula toxicidad. Además, presentan una estructura similar a la de las membranas celulares [8].

Se componen de fosfolípidos, moléculas anfipáticas (formadas por una **cabeza** hidrofílica, soluble en agua, y dos **cadenas** hidrofóbicas apolares, rechazan el agua) que forman membranas (Figura 4). Las cabezas interactúan con el medio acuoso y las cadenas interactúan entre ellas. Si se introducen en una solución acuosa se forman dos capas lipídicas. Las cadenas de cada capa formada se enfrentan entre sí creando una barrera de permeabilidad. Dependiendo de la naturaleza de los lípidos, de la temperatura y de su forma geométrica, estos se organizarán de distintas formas creando distintas nanopartículas como las que aparecen en la Figura 3

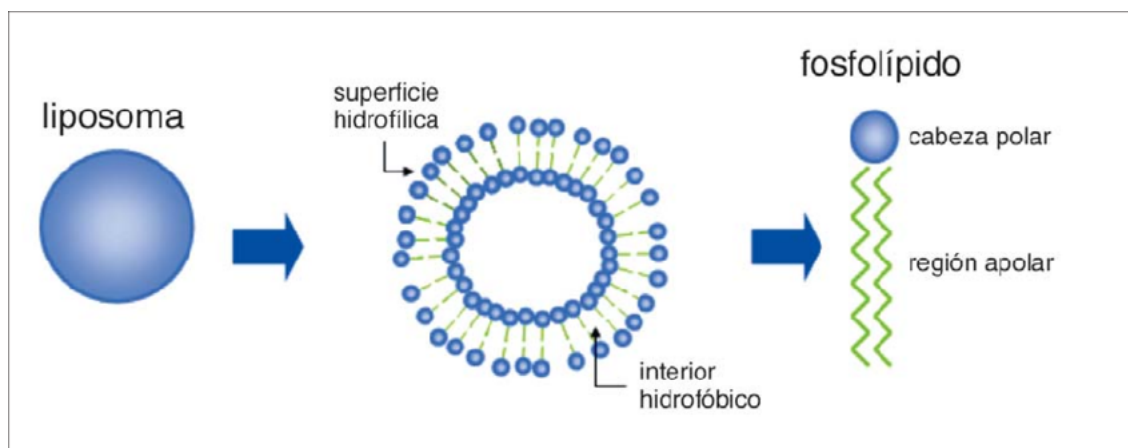


Figura 4: Naturaleza anfífilica de los liposomas. Esto les permite vehiculizar sustancias hidrofílicas en la superficie tanto interna como externa de la membrana y sustancias hidrofóbicas disueltas en el interior de la bicapa fosfolipídica [9].

[8]. Mientras que los liposomas se componen de una bicapa lipídica, las micelas se construyen con una monocapa lipídica en la que la sección apolar gira hacia el centro de la esfera y las cabezas polares interactúan con el medio acuoso. El volumen de encapsulación en las micelas es muy inferior al de los liposomas.

Factores que han de tenerse en cuenta para que sean considerados como unos buenos portadores de medicamentos son su composición lipídica, su tamaño y su carga superficial [10].

Como ya se ha mencionado, los liposomas son vesículas esféricas que se forman tras la dispersión de los lípidos en un medio acuoso. Se pueden formar de infinidad de tamaños, desde los 20 nm hasta varias decenas de μm [11]. La diferencia de tamaño depende de la técnica empleada en la síntesis de estos sistemas.

Los liposomas pueden clasificarse según el método de preparación (por ejemplo, mediante la técnica de extrusión de vesículas), tamaño y lamellaridad (vesículas uni, bi o plurilamelares). La formación de vesículas unilamelares (ULV) o vesículas multilamelares (MLV) depende de los métodos de síntesis y el procesamiento de postformación utilizados para su preparación. Además, se pueden clasificar en función de la composición y del mecanismo de administración intracelular: convencionales, sensibles al pH o a la temperatura, y su carga superficial: catiónicos o aniónicos e inmunoliposomas [12].

Una de las propiedades que más aplicaciones tiene en este campo, es que los liposomas son capaces de incorporar moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y anfífilicas, pudiendo encapsular así, casi cualquier fármaco o agente terapéutico. Algunos ejemplos importantes de las aplicaciones de los liposomas como transportadores de fármacos son el *Doxil* (Sequus Pharmaceuticals, Menlo Park, California) para la terapia del sarcoma de Kaposi en SIDA, que consiste en una formulación liposomal pegilada de la doxorubicina (antibiótico que actúa sobre células cancerosas) aplicada por vía intravenosa y el *Ambisome* (NeXstar Pharmaceutical) para el tratamiento de infecciones por hongos, que es una formulación liposomal de anfotericina B (antibiótico y antifúngico) [7].

Como se ha mencionado antes, hay gran variedad de liposomas aunque en este trabajo se han empleado tres tipos concretos de liposomas atendiendo a su carga superficial: catiónico: Lipo-Cat, aniónico: Lipo-N y aniónicos tiolados: Lipo-N-SH (Nanovex Biotechnologies SL). La formulación de Pronanosome Lipo-Cat está diseñada para obtener liposomas cargados positivamente (liposomas catiónicos). Las nanovesículas catiónicas pueden ser endocitadas por las células para lograr el suministro intracelular. Por otro lado, la formulación de Pronanosome Lipo-N está diseñada para obtener liposomas de fosfolípidos naturales cargados negativamente. Finalmente, el último tipo de liposoma que se ha usado ha sido encargado específicamente a los laboratorios Nanovex. El Pronanosome Lipo-N-SH (PNS-LN-SH) es Lipo-N unido a grupos tioles (un compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno -SH 1%) que tienen gran afección por el oro. Dado que los lípidos empleados en este trabajo para realizar las síntesis de los liposomas son comerciales, no se tiene control sobre su composición y, además, esta no se conoce de manera precisa. Sí sabemos que el lípido principal es el colesterol y en el caso de los Lipo-Cat se hace uso de la acetilcolina, que tiene carga positiva y por ello estos son positivos [13].

1.4. Nanopartículas de oro

El campo de la nanotecnología está experimentando un gran auge en cuanto a la investigación científica gracias al potencial que puede desarrollar en multitud de campos como la medicina, la energía, la cosmética, etc. La nanociencia se encarga de estudiar y trabajar con materiales y estructuras a escalas nanométricas.

En el caso del presente TFG, las nanopartículas que vamos a utilizar son NPs metálicas de oro (AuNPs). Este tipo de nanopartículas exhiben unas propiedades que son intrínsecas al tamaño nanométrico, como por ejemplo la absorción de luz, como se verá más adelante, que varía en función del tamaño.

Hay múltiples estudios que afirman el gran potencial de las AuNPs como sensores y agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer. También destaca la utilidad de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que esta puede desencadenarse por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) [14] o a partir de estímulos externos.

Hay un gran interés, como se ha mencionado antes, por las AuNPs debido a su baja toxicidad. De acuerdo con *Connor y col*, las nanopartículas de oro son inertes y no-tóxicas [15].

Es apreciable la facilidad de síntesis y multifuncionalidad de estas nanopartículas metálicas. Mediante métodos sencillos se pueden preparar AuNPs, obteniendo sistemas monodispersos estables con tamaños entre 1 nm y 100 nm, donde se puede controlar muy bien el tamaño requerido. Faraday fue el primero en preparar en 1857 oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño [14]. Después de este experimento Mie corroboró la relación existente entre el tamaño y el color de las nanopartículas dentro de la escala nanométrica. Así, se ha seguido el método Turkevich en la preparación de las AuNPs por reducción de sales de oro (utilizando

generalmente citrato como agente reductor y estabilizante) [1]. Se comprobó que cuanto más rápida era la adición del agente reductor, más pequeñas y monodispersas eran las AuNPs que se formaban [16] .

1.4.1. Fototerapia

Los materiales plasmónicos (ver sección 2.5) tienen la habilidad de transformar la luz absorbida en calor, conocido como efecto fototérmico. El uso de la radiación electromagnética se ha explorado durante muchos años para su uso en varias aplicaciones como son la terapia fototérmica, liberación de drogas, imagen o biosensores [17]. En el caso de las AuNPs, se pueden apreciar unas ventajas adicionales respecto a otros metales. Si hacemos una comparación con otros materiales metálicos como la plata o el cobre, el oro es el más noble y por ello es considerado uno de los más seguros y estables [18]. Por otra parte, una cualidad muy ventajosa es que las propiedades ópticas de las AuNPs se pueden diseñar para que estén en el infrarrojo cercano (conocido como ventana biológica) donde la absorción de los componentes biológicos es limitada [19]. Por último, gracias a la facilidad de síntesis de estas partículas, se pueden preparar para objetivos muy específicos con la única necesidad de variar la forma, el tamaño y funcionalización de su superficie.

Los métodos convencionales, por ejemplo, la tecnología de Ultrasonido Focalizado de Alta Intensidad (HIFU), aplican energía desde el exterior del cuerpo como ultrasonidos, microondas, etc [20], de manera que el calor inducido es rápidamente disipado. En cambio, en la fototerapia, la forma de actuar de las AuNPs es completamente diferente, provocan la hipertermia a partir de sus propiedades físico-químicas que les permiten transformar la energía absorbida en forma de radiación electromagnética en calor. Se trata de un proceso más selectivo. La hipertermia suave ($\leq 43^{\circ}\text{C}$) es un complemento perfecto de la radioterapia y quimioterapia convencional [17], aunque existe una gran dificultad para monitorizar la temperatura y, por ello, esta técnica no se suele utilizar en aplicaciones clínicas a día de hoy. Así mismo, las AuNPs se pueden dirigir al tejido en el que se quiera realizar el tratamiento de forma que irradiando con luz infrarroja, en torno a 800 nm, hace que el aumento de temperatura se genere en el mismo tumor y el calor se disipe de dentro hacia fuera generando necrosis en las células tumorales. Gracias a esto, el calor que se genera en los tejidos sanos es mínimo, ya que, además, la longitud de onda de resonancia depende de la forma y tamaño de la AuNP [21], así, si la banda está en el NIR, tenemos la ventaja de que los tejidos no absorben. La nanotecnología ha sido la que ha guiado en la mejora de esta técnica haciendo posible el uso de la terapia fototérmica para la eliminación de células tumorales mediante ablación térmica [22].

Concretando más para los experimentos de este TFG, es importante que las AuNPs que se empleen sean estables ya que si se agregaran, cambiarían su plasmón, lo que provocaría una pérdida de eficiencia a la hora de convertir la luz de una longitud de onda resonante en calor.

1.5. Nanomedicina

Tras los muchos avances tecnológicos que se han conseguido en el ámbito de las aplicaciones clínicas, las nanopartículas demuestran tener una gran utilidad. Así surge la nanomedicina, la unión de la medicina y las herramientas de la nanotecnología, que se encarga de prevenir, diagnosticar y curar enfermedades (teranóstica). Los nanomateriales utilizados en estos procesos rebajan mucho las limitaciones que presentan los actuales métodos de cura, como los fármacos convencionales. Además, el transporte de medicamentos en nanopartículas ha experimentado varias mejoras como la reducción de su toxicidad, el incremento de su solubilidad y la liberación controlada en el tiempo del fármaco [23].

Todo esto permite emplear dosis más pequeñas de fármaco para obtener efectos terapéuticos y disminuir la acumulación innecesaria del medicamento en tejidos y órganos sanos, además de conseguir una mejora del tratamiento y reducir considerablemente los efectos secundarios que se puedan producir.

La nanomedicina agrupa tres grandes áreas: el nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos (nanoterapia) y la medicina regenerativa. El nanodiagnóstico detecta enfermedades gracias al desarrollo de sistemas de análisis y de imagen. La nanoterapia pretende dirigir nanosistemas para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas. La medicina regenerativa repara o reemplaza tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas (implantes, prótesis) [24].

La nanoterapia sería el fin último del que este trabajo es un primer paso. Además de elementos de reconocimiento y diagnóstico, las nanopartículas podrían utilizarse también como agentes terapéuticos. Una vez las nanopartículas se unen a tejidos dañados o a células cancerosas, se puede inducir su calentamiento mediante aplicación de un campo magnético alterno (para nanopartículas magnéticas) o por irradiación con un láser infrarrojo (para nanopartículas plasmónicas). A pesar de que los mecanismos son diferentes, en ambos casos el calentamiento provoca la destrucción de las células tumorales por hipertermia, sin afectar a las células o tejidos sanos que las rodean. Esto evitaría los efectos secundarios de los actuales tratamientos de quimioterapia o radioterapia.

Un ejemplo de nanoterapia es la desarrollada por la empresa alemana MagForce Nanotechnologies AG, que recibió en julio de 2010 la aprobación de la Agencia Europea del Medicamento. Se basa en el uso de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de aminosilano, inyectadas en la zona del tumor y posteriormente mediante la aplicación de un campo magnético alterno de alta frecuencia, produce un calentamiento local de la zona tumoral debido a la absorción de las nanopartículas y, por consiguiente, la destrucción de las células cancerosas. La terapia podría aplicarse a diferentes tipos de tumores sólidos [24]. Además, estas mismas NPs se pueden emplear como agente de contraste en imágenes de resonancia magnética, reemplazando a las sales de galodinio que presentan alta citotoxicidad.

2. Método experimental

A lo largo del presente TFG se han llevado a cabo una serie de procedimientos experimentales que se detallarán a continuación: síntesis de AuNPs, síntesis de liposomas, caracterización mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, preparación y tinción de las muestras para el microscopio electrónico de transmisión (TEM) para su posterior caracterización de morfología y tamaño.

2.1. Síntesis de AuNPs

Para realizar la síntesis de las AuNPs se ha seguido el método de Turkevich-Frens [1]. Con este método se sintetizan mayoritariamente nanopartículas cuasi-esféricas de oro dispersadas en agua formando una suspensión coloidal y funcionalizadas con citrato sódico (para evitar que se agreguen). Se realiza en una solución acuosa donde se reduce el ácido tetracloráurico (HAuCl_4) a 100°C con citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Con este método se pueden obtener nanopartículas de un tamaño entre 10-150 nm. El citrato actúa como agente reductor y como estabilizador.

Procedimiento síntesis:

1. La disolución acuosa de HAuCl_4 se calienta en una placa calefactora con agitación magnética hasta una temperatura en torno a 100°C . Para ello se prepara la disolución acuosa del ácido tetracloráurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) con $M=398.83$ g/mol. Para obtener una disolución de 0.125 M de HAuCl_4 se siguen los siguientes pasos: Se dispone de 1 g de HAuCl_4 , es decir,

$$\frac{1\text{mol} \cdot 1\text{g}}{393,83\text{g}} = 2,54 \cdot 10^{-3} \text{ moles}$$

Para una concentración de 0.125 M:

$$0,125\text{M} = \frac{2,54 \cdot 10^{-3}}{V(\text{L})} \rightarrow V=20.32 \text{ mL de H}_2\text{O}$$

se necesitan 20.32 mL de H_2O para obtener una disolución de HAuCl_4 0.125 M.

Se tiene una concentración de 125 mM y se requiere para los experimentos una concentración de 0.5 mM:

- Conseguir 10 mL de 50 mM.
- Siguiendo la fórmula de la dilución (reducción de la cantidad de soluto por unidad de volumen de disolución): $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$, donde C es la concentración y V el volumen.

$$\frac{125\text{mM}}{V_{\text{final}}} = \frac{50\text{mM}}{10}$$

Hay que tomar 4 mL de HAuCl_4 y 6 mL de H_2O .

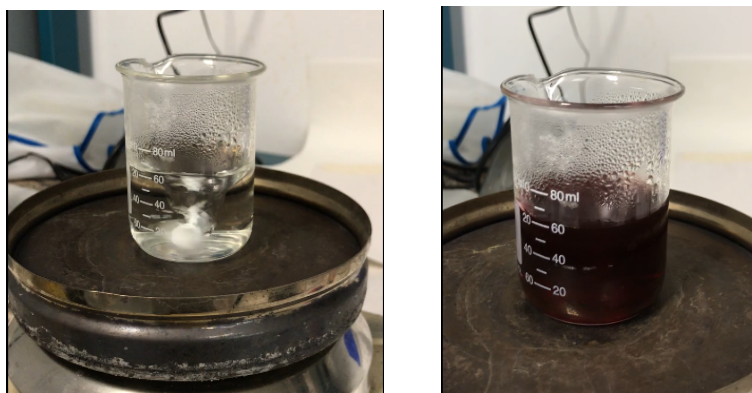
- Finalmente se toman 0.5 mL de la disolución anterior (50 mM) y se añade a 49.5 mL de H₂O previamente calentada a 100°C en una placa calefactora con agitación magnética.
2. Se añade el agente reductor (citrato trisódico) a la disolución:
Se tienen 50 mL de HAuCl₄ a 0.5 mM, es decir, $\frac{0,5 \text{ mol}/1000}{\times} 0,05 \text{ L} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ de HAuCl₄, y vamos a añadir citrato con una relación de 2 a 1 (moles de citrato a moles de oro), esto equivale a 0.0147 g de citrato ($M=294.1 \text{ g/mol}$).

$$2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \times 2 \times 294,1 \text{ g/mol} = 0,0147 \text{ g}$$

Como ya se ha mencionado, el citrato de sodio tiene dos funciones en la síntesis. Se comporta como el agente reductor en la síntesis, puesto que reduce el oro Au³⁺ a oro metálico Au⁰ y es el agente estabilizador de las AuNPs recubriendo su superficie y evitando su agregación. Cuanto menos citrato se introduzca, más grandes serán las partículas ya que habrá menos para recubrir las partículas y se formarán agregados, por ello es muy importante tener en cuenta la relación de concentración citrato-oro.

3. Finalmente se deja 10 minutos tras los cuales se produce el crecimiento por agregación formado por nucleación y posterior crecimiento por adhesión.

Se observa como la disolución presenta un color rojizo (Figura 5), que es característico de las AuNPs en suspensión coloidal de un tamaño en torno a 30 nm.



(a) Síntesis de AuNPs al empezar el procedimiento.

(b) Síntesis de AuNPs al acabar con un tono rojizo.

Figura 5: a) Disolución acuosa del HAuCl₄ y b) AuNPs después de añadir el citrato de sodio a una temperatura próxima a la de ebullición del agua. El color rojizo obtenido nos da una estimación del tamaño de las AuNPs (30 nm).

Mediante esta síntesis se han obtenido AuNPs monodispersas en suspensión coloidal con color rojo-granate que corrobora junto con otros métodos un tamaño comprendido entre 20 y 30 nm, debido a que, absorben longitudes de onda en el azul y dispersan el resto.

2.2. Síntesis de liposomas

Para la síntesis de los liposomas se han seguido los mismos pasos para los tres tipos empleados, salvo las modificaciones que se especifican en la sección *3.2 Características liposomas*.

En la Figura 6 está representado un esquema de los pasos que se han seguido para la síntesis de los liposomas.

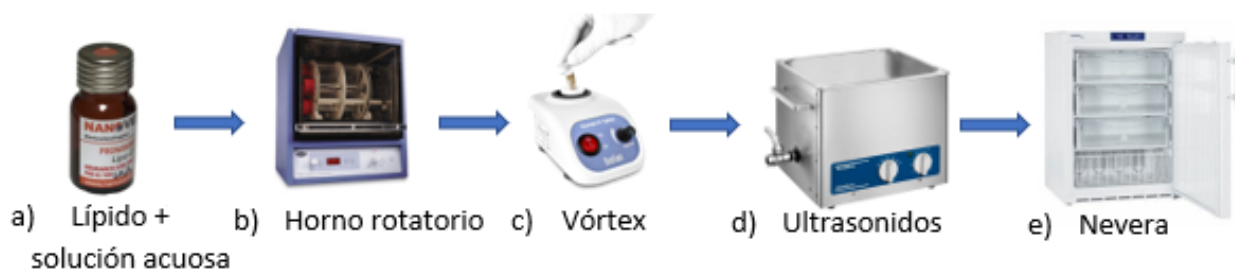


Figura 6: Esquema de los pasos seguidos en la síntesis de los liposomas.

La secuencia es la siguiente:

a) Se introduce en un bote, el lípido, el agua con una determinada concentración. b) Posteriormente se hidrata el lípido mediante una ligera agitación, para ello se introduce la mezcla en un horno (previamente calentado a 50°C) durante 20 minutos. Una vez transcurridos los 20 minutos, c) se coloca el bote en un vórtex durante dos minutos para agitar enérgicamente la mezcla. Después d) se colocan los liposomas en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos y finalmente e) se dejan durante un mínimo de 12 h en una nevera.

- Lipo-N La síntesis se realiza al mismo tiempo que se introducen las AuNPs, es decir, en el proceso de formación de los liposomas, las AuNPs ya están en la solución acuosa. Así forzamos a que las nanopartículas se queden en el interior del liposoma o que se alejen de ellos debido a que sus superficies poseen cargas del mismo signo.
- Lipo-Cat La síntesis se realiza sin las AuNPs dado que las cargas son opuestas, posteriormente cuando se añadan las nanopartículas, estas se pegarán a la superficie de los liposomas directamente o se producirá una agregación.
- Lipo-N-SH Para este último caso, la síntesis se ha realizado de la misma forma que el Lipo-Cat ya que aunque el liposoma siga siendo de carga negativa, los grupos tioles (-SH) tienen afinidad por las AuNPs y al igual que con los lipo-Cat, se espera que se adhieran a su superficie.

Las concentraciones irán variando en cada síntesis hasta encontrar la mejor forma de obtener lo deseado: una distribución homogénea de las NPs en los liposomas.

Para unir los Lipo-Cat a las AuNPs se emplearon dos métodos: bien se agitan en el baño de ultrasonidos las AuNPs y los liposomas por separado y luego se mezclan o bien, se juntan (liposoma y AuNP) y después se realiza la agitación en el baño.

La razón de hacerlo de distinta forma en función del liposoma empleado es porque cada liposoma tiene la superficie cargada positiva o negativamente y esto afecta, como se ha mencionado antes, de forma diferente en cada uno.

2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) [25] es un microscopio donde un haz de electrones es acelerado y atraviesa la muestra de un espesor inferior a 100 nm.

Durante el siglo XX, se descubrió que los electrones poseían un carácter ondulatorio y al mismo tiempo se comportan como partículas cargadas negativamente. De acuerdo con Louis de Broglie la longitud de onda del electrón viene dada por:

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (1)$$

donde $h=6.626 \cdot 10^{-34}$ J·s es la constante de Planck y p el momento lineal del electrón ($p = m \cdot v$). Si se emiten electrones en el vacío desde un filamento calentado (efecto Edison) y se aceleran mediante una diferencia de potencial de ≈ 80 V tendrán una velocidad aproximada de $v \approx 4.2 \cdot 10^6$ m/s y una longitud de onda de $\lambda=0.17$ nm. Dado que esta longitud de onda es comparable a las dimensiones atómicas, los electrones se difractan fuertemente. Todo esto sin considerar efectos relativistas, es decir, $m \equiv m_{\text{electrón}}$.

Si se aumenta el potencial hasta 50 kV, la longitud de onda se reduce a 0.5 Å aproximadamente y entonces estos electrones tendrán mucha más energía y podrán penetrar distancias de varios μm en un sólido. Se puede formar un patrón de difracción de electrones de transmisión a partir de electrones que han pasado a través de una muestra delgada si el sólido es cristalino, ya que los electrones se difractan por planos atómicos dentro del material. G.P Thomson en 1927 descubrió además de esto, que si los electrones podían enfocarse en un haz (es aquí donde se pone de manifiesto su comportamiento como onda), su longitud de onda permitiría que la muestra fuese fotografiada con una resolución espacial mayor que la del microscopio óptico de luz.

Con el TEM se obtiene la señal que viene de la proyección de la muestra en 2D, dado que observamos los electrones que se transmiten y los que no a través de la muestra, detectándolos bien en una pantalla o en una CCD.

El TEM (Figura 7) está constituido por los siguientes elementos esenciales:

- Cañón de electrones: compuesto por un filamento (cátodo) que calentado indirectamente mediante un filamento espiral, emite electrones por termoemisión (efecto Edison); un cilindro de Wehnelt que rodea el cátodo y posee una diferencia de potencial negativa respecto a él, esta diferencia permite modular la intensidad del haz de electrones, y con ello el brillo del punto luminoso que desprende el tubo de rayos catódicos; y finalmente un ánodo que permite enfocar el haz y hacer que impacte en un área muy pequeña de la pantalla.

- Lentes magnéticas: son las encargadas de manipular el tamaño del haz de electrones, direccionarlo y focalizarlo sobre la muestra.
- Sistema de vacío: necesario para evitar que los electrones sufran absorción o desviaciones en el aire.
- Pantalla fluorescente: la imagen aumentada se proyecta en esta pantalla.
- Cámara CCD (en inglés Charge-Coupled Device): es un sensor construido de materiales semiconductores encargado de registrar la imagen.



Figura 7: Microscopio electrónico de transmisión utilizado en la caracterización de las nanopartículas y los liposomas del Servicio de Microscopía del Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL).

Gracias al microscopio electrónico de transmisión se han obtenido las imágenes de los liposomas y nanopartículas que se han sintetizado en este trabajo. A partir de estas imágenes se obtienen los tamaños de las AuNPs y de los distintos tipos de liposomas y se comprueba la situación de las AuNPs con respecto a los liposomas.

2.4. Preparación y tinción de muestras TEM

- Preparación de muestras del TEM:
Se utiliza un trozo de Parafilm[®] (lámina de un material de superficie hidrofóbica) para cada rejilla que se vaya a observar con el TEM.

Las rejillas de TEM (Figura 9) son unas rejillas de cobre recubiertas por una fina capa de carbono (grafito). Las películas continuas de carbono proporcionan un soporte delgado y transparente a los electrones, para visualizar las nanopartículas.

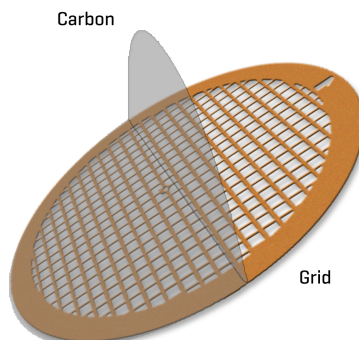


Figura 8: Rejilla de TEM (grid) empleada para observar las nanopartículas y los liposomas con el TEM. La red está fabricada con cobre y recubierta con una fina película de carbono.

Se añaden 10 μL de la muestra con las NPs y/o liposomas en suspensión sobre la rejilla. Transcurrido un tiempo, la muestra suspendida (los liposomas y/o nanopartículas) sedimenta debido a la evaporación del líquido y se adherirá a la lámina. En nuestro caso se ha dejado un mínimo de 5 minutos y posteriormente se ha retirado el exceso de agua con papel de filtro.

- Tinción de las muestras: Las muestras están compuestas principalmente de carbono (liposomas) por lo que no hay suficiente contraste con la película de carbono y es necesario teñir las muestras.

Para teñir las muestras se emplea acetato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y se realiza bajo las condiciones de seguridad necesarias. Una vez transcurrido un mínimo de 5 minutos, se deposita una gota de 10 μL de acetato de uranilo sobre la muestra y se deja actuar sobre ella un minuto. Para aclarar el uranilo, se coloca la rejilla encima de una gota de agua destilada de 10 μL y se espera otro minuto. Para realizar un buen aclarado de la muestra, este último proceso de limpieza con gotas de agua se realizó un total de tres veces.

Finalmente, se vuelve a colocar la rejilla boca arriba y se retira el exceso de agua que haya podido quedar con ayuda de un trozo de papel filtrante y se deja secar.

2.5. Espectroscopía de absorción UV-Vis

La espectroscopía estudia las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia. Esta radiación es de carácter ondulatorio y su energía responde a:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$



Figura 9: Esquema tinción muestra.

siendo h la constante de Planck, ν la frecuencia y λ la longitud de onda que caracteriza a la energía de radiación. En función de esta longitud de onda (λ), se establecen distintas regiones del espectro electromagnético: rayos cósmicos, rayos gamma (γ), rayos X, radiación ultravioleta-visible (UV-Vis), radiación infrarroja, microondas,...

En este trabajo se emplea la espectroscopía UV-Vis (rango 300-800 nm), que estudia la capacidad de absorber o dispersar la luz incidente por un material en función de la longitud de onda.

Tras incidir la luz sobre la muestra, se pueden producir distintos fenómenos: transmisión, reflexión, refracción, absorción y scattering o dispersión. Para el estudio se ha empleado un espectrofotómetro (Cary-50), con el que se ha medido la intensidad de la luz transmitida por la muestra. Así es posible conocer la contribución conjunta de absorción y dispersión de una determinada disolución.

Tras el efecto de absorción, la energía que incide sobre la muestra se puede emitir de nuevo o sufrir una transformación en otra forma de energía como el calor, lo que determina una de las propiedades más importantes (fototermia) en el ámbito de este trabajo, que ya se ha comentado en la sección 1 de las características de las nanopartículas.

El Cary 50 es un espectrofotómetro de simple haz que está compuesto de una fuente de luz (lámpara de xenón pulsada), un monocromador y un detector. El monocromador se encarga de separar las distintas longitudes de onda y el detector está compuesto por un fotodiodo de silicio (Figura 10).

A través de la espectroscopía UV-Vis se puede estudiar el tamaño de las nanopartículas de oro ya que la longitud de onda de la resonancia del plasmón de superficie (RPS) obtenido del espectro de absorción está relacionada con su tamaño. En la Figura 11 se puede ver la relación que hay entre estos dos valores.

La RPS, se debe al acoplamiento entre la frecuencia de la radiación incidente y la nube de electrones libres que se encuentran en la superficie de las nanopartículas metálicas. Es una excitación electromagnética de los electrones que se produce cuando un haz de luz incide sobre ellos y produce una oscilación deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas. Cuando la frecuencia de la radiación incidente se acopla con la

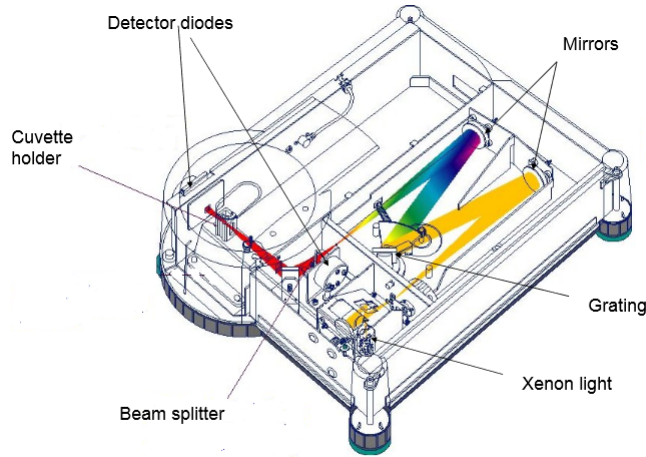


Figura 10: Visión esquemática del interior del Cary 50.

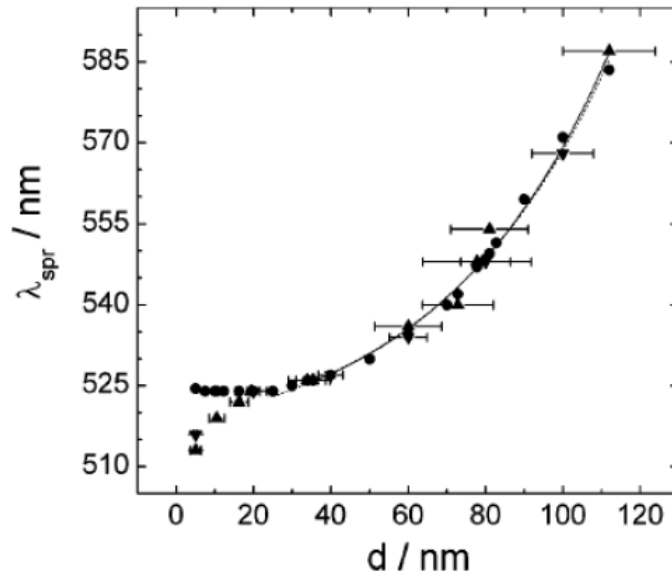


Figura 11: Posición del pico de la RPS (λ_{max}) en función del diámetro medio de AuNPs. Los datos calculados corresponden a los círculos y los experimentales a los triángulos [26].

oscilación de los electrones, se produce RPS y es capaz de absorber determinadas frecuencias y transmitir el resto, que dan el color característico a la suspensión coloidal de las partículas.

La resonancia en el caso del oro tiene su máximo en el rango visible del espectro electromagnético (para NPs esféricas de tamaño inferior a 80 nm). Se produce cuando el tamaño de las partículas es mucho menor que la longitud de onda incidente ($d \ll \lambda$). Los picos del espectro se pueden desplazar cuando cambia el tamaño, la forma y el estado de agregación de las partículas. La RPS también depende de la concentración de las nanopartículas y de su distribución espacial. [27]

En el caso de nuestras nanopartículas el diámetro es aproximadamente $d \approx 30$ nm, la RPS

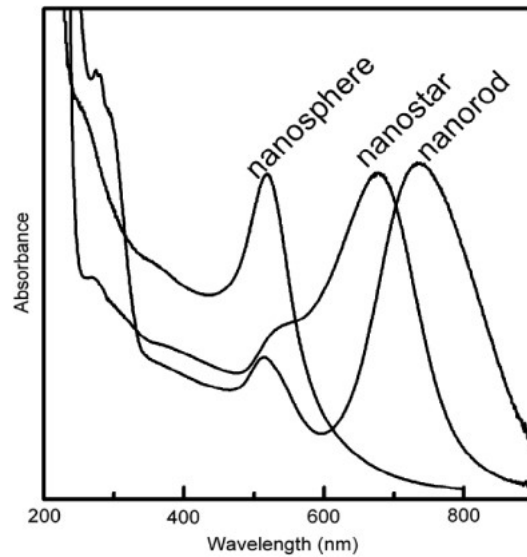


Figura 12: Ejemplo de espectros de absorbancia de dispersiones coloidales de nanopartículas de Au. Dependiendo del máximo en la longitud de onda y de la anchura del pico, se puede identificar el tipo de nanopartículas [27]

absorbe la radiación en el rango del espectro azul-verde y la luz dispersada es su complementaria, roja.

En función del tamaño de las NPs, la suspensión coloidal tendrá distinto color, desde el rojo (menor tamaño) hasta el azul (mayor tamaño) (Figura 13).

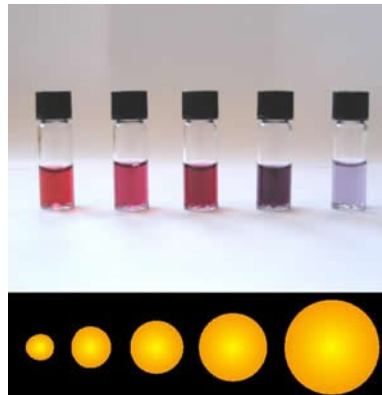


Figura 13: Relación entre el tamaño y el color de las nanopartículas de oro. Las más pequeñas son más rojas y las más grandes, azules.

Si sobre una muestra de espesor b incide un haz de luz de una determinada longitud de onda con una intensidad I_0 , ésta empieza a disminuir debido a que la muestra absorbe parte de esa radiación incidente. Siendo su nueva intensidad I , el cociente entre las dos es conocido como transmitancia $T = \frac{I}{I_0}$.

La absorbancia, o densidad óptica, es el logaritmo de la transmitancia cambiado de signo: $A = \log(I_0/I) = -\log T$.

Si la muestra no absorbe ni dispersa radiación, I e I_0 coinciden, por tanto $A=0$ y se transmite toda la radiación $T=1$.

La absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia, c , por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación: $A = \epsilon bc$, donde c se expresa en mol/L, b es la longitud del camino óptico de la cubeta (≈ 1 cm) y se expresa en cm, y ϵ es coeficiente de extinción molar medido en $\frac{\text{L}}{\text{mol cm}}$. Para poder aplicar la ley de Lambert-Beer es necesario seleccionar previamente una longitud de onda, puesto que tanto A como ϵ varían con ella. La λ seleccionada corresponde con el máximo del pico de absorción.

2.6. Entorno de trabajo

En esta sección se presenta el entorno de trabajo en el que he realizado la parte experimental del trabajo.

En el laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Cantabria se llevó a cabo la síntesis de las AuNPs. A continuación podemos ver el precursor de oro empleado en la síntesis (Figura 14).

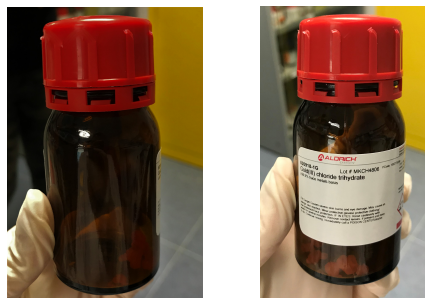
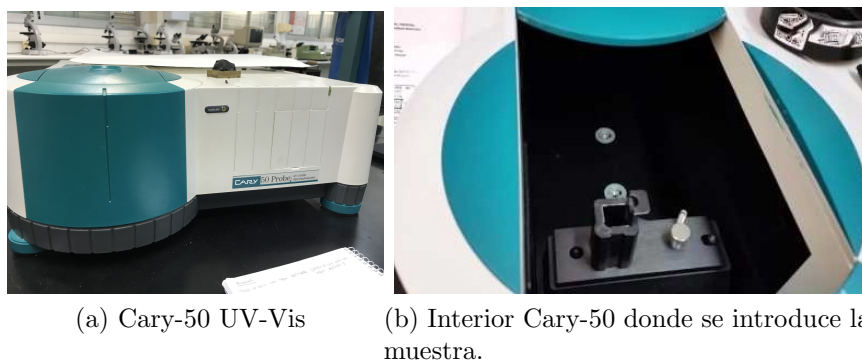


Figura 14: Precursor de oro empleado en la síntesis de las AuNPs.

Por otro lado, los espectros de absorción los he obtenido en el CITIMAC (Departamento de Ciencias de la Tierra y Física de la Materia Condensada) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cantabria. Adjunto fotos del espectrofotómetro utilizado (Figura 15).



(a) Cary-50 UV-Vis

(b) Interior Cary-50 donde se introduce la muestra.

Figura 15: Espectrofotómetro empleado en la obtención de los espectros de absorción.

La síntesis de los liposomas se realizó en el laboratorio de Nanomedicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Cantabria. En la Figura 16 se muestran distintas fotos que representan los diferentes ensayos para la síntesis de liposomas y cómo se aplica el vórtex.



Figura 16: Botes utilizados para las síntesis de los liposomas.

En la Figura 17 se pueden ver las disoluciones de liposomas en los Eppendorf[®], que son los recipientes en los que se almacenan.

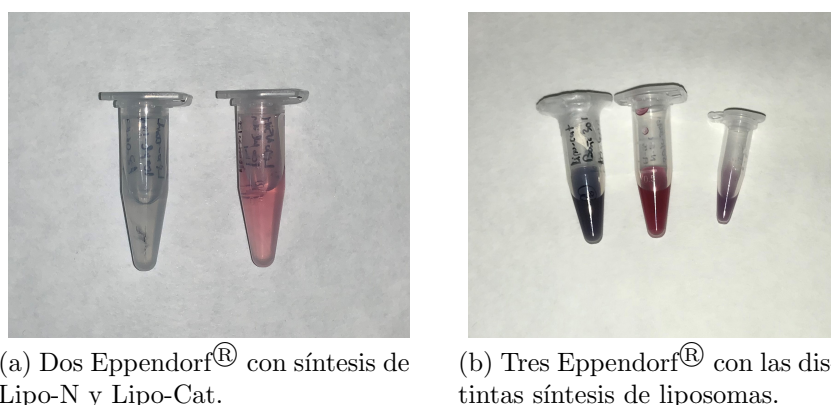


Figura 17: Distintos Eppendorf[®] utilizados a lo largo de los experimentos para la unión de liposomas con AuNPs.

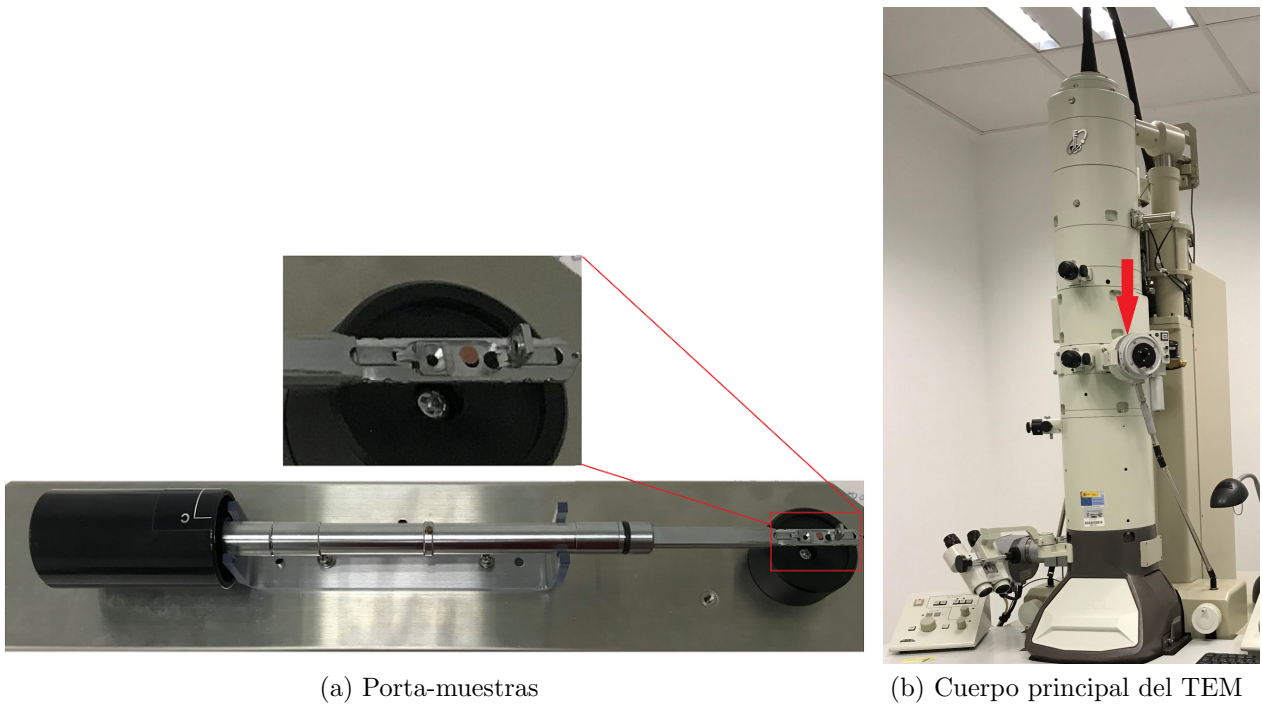
En la Figura 18 se muestra la mesa de trabajo en la que realicé las síntesis de los liposomas. En ella siempre disponía de pipetas de distinta capacidad, Eppendorf[®], pinzas, agua destilada, botes... para poder realizar todos los experimentos.

Para finalizar, recalcar que tuve la suerte de poder trabajar yo misma con todos los instrumentos (con la supervisión de mi director y codirector). Cabe destacar el uso del TEM: Cada vez que se realiza una tanda de liposomas, se procede, como ya se ha comentado, a la tinción y preparación de las muestras. Una vez preparadas se ponen en las rejillas y se llevan hasta el IDIVAL donde se encuentra el TEM.

En la Figura 19 (a) se puede ver el porta-muestras del TEM, hay sitio para dos rejillas (ampliado en la foto). Una vez colocadas, el portamuestras se introduce en el TEM (flecha roja de la Figura 19 (b)). La muestra se somete al vacío en el interior de la columna. En ese tiempo se está induciendo el vacío en el interior y cada vez que suena, es posible introducir el portamuestras con la rejilla sin romperlo.



Figura 18: Mesa de trabajo donde se organizaban las síntesis y sus concentraciones.



(a) Porta-muestras

(b) Cuerpo principal del TEM

Figura 19: Componentes del TEM.

Una vez introducido el portamuestras, se focaliza el haz de electrones para localizar las muestras en la rejilla correspondiente. Con ayuda de unas ruedas es posible desplazar en ambos ejes, x e y , para buscar los liposomas con AuNPs a lo largo de toda la rejilla. Una vez encontrados los de interés, se puede aumentar la imagen y hacer capturas obteniendo tantas como sea necesario.

Detalle del TEM donde aparece la pantalla de fósforo con su tapa, los controles y la pantalla del ordenador con una de las imágenes recogidas por la CCD.



Figura 20: Pantalla con la que se observaban los liposomas y los AuNPs.

3. Resultados

3.1. Caracterización de las AuNPs

Tras la síntesis de las AuNPs se ha llevado a cabo el estudio de la absorción UV-Vis para obtener, a partir de la resonancia del plasmón de superficie, el tamaño de las nanopartículas. El espectro de extinción (absorción + scattering) de la Figura 21 muestra efectos de saturación de modo que la concentración de la muestra era de 0.8 mM, no como se pensaba inicialmente (0.5 mM). El aumento de la concentración de las nanopartículas está relacionada con la evaporación de agua durante la síntesis de las AuNPs.

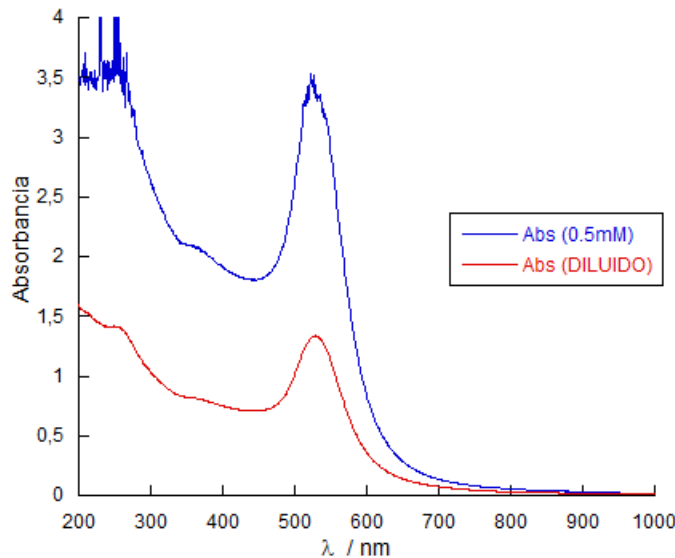


Figura 21: Espectro de absorción (extinción) de las AuNPs. Hay dos señales, la de las AuNPs sin diluir y la de las diluidas.

A partir del espectro de la Figura 21 se puede obtener información sobre el tamaño y concentración de las AuNPs en la suspensión coloidal. Toda esta información está resumida en la Tabla 1.

Hay del orden de $6 \cdot 10^{11}$ nanopartículas por mL.

En el espectro de absorción están representadas la absorbancia de la muestra y la absorbancia de la muestra diluida. Previamente se obtuvo la línea base con una primera medida, donde las cubetas de cuarzo estaban llenas de agua, que es el medio en el que estaban dispersas las AuNPs.

Las nanopartículas sintetizadas tienen un tamaño medio de $\langle d \rangle = 29 \pm 5$ nm (Figura 22 (b)). El diámetro de las NPs se ha obtenido mediante el programa ImageJ. A partir de distintas imágenes obtenidas con el TEM se ha ido marcando la circunferencia de las AuNPs y posteriormente se obtuvo el diámetro de la partícula. En la Figura 22 (a) hay una vista general de la morfología y tamaño de las AuNPs. A partir de $N=249$ AuNPs se ha obtenido el diámetro medio y su desviación estándar asumiendo una distribución de tipo gaussiana.

Nanopartículas	
Diámetro (nm)	29,2
Volumen (cm ³)	$1,30361 \cdot 10^{-17}$
Densidad (g/cm ³)	19,32
Masa atómica (uma)	196,97
Masa (kg)	$2,51857 \cdot 10^{-16}$
Nº AuNPs/mol	$7,8207 \cdot 10^{17}$
Mol/mL	0.0008
Absorbancia a 400	0,755
Concentración (NPs/mL)	$6,256 \cdot 10^{11}$

Tabla 1: Resumen de los datos obtenidos y estimados de las nanopartículas a partir del espectro de absorción.

En la Figura 22 (a) se representa el histograma con las medidas. Este valor está de acuerdo con el estimado a partir del espectro de absorción.

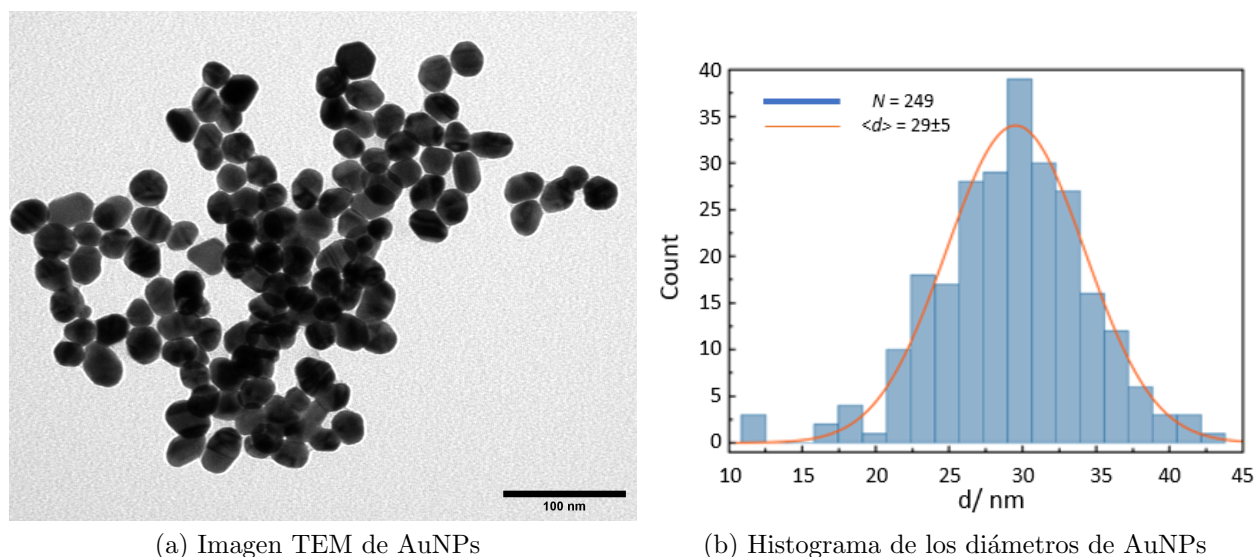


Figura 22: a) Imagen del TEM de AuNPs. En la figura hay ≈ 130 NPs b) Histograma de los diámetros de las AuNPs para la obtención del tamaño medio de estas y ajuste a una gaussiana.

Al acabar todos los experimentos se midió otra vez el espectro de absorción de las AuNPs para verificar si la posición del plasmón se había desplazado de longitud de onda, lo que indicaría que las AuNPs se habían agregado. Viendo que el plasmón no se ha movido, como se observa en la Figura 23 (el λ_{max} se encuentra en el mismo valor de 528 nm) se puede contrastar la estabilidad de las NPs.

Se ve como la concentración de las nanopartículas ha disminuido. La absorbancia es mucho mayor al principio que una vez realizados los experimentos y empleadas las AuNPs. Esto

puede ser debido a que las AuNPs tienden a caer al fondo del recipiente y, aunque siempre se sonica antes de utilizar las NPs para homogeneizar su distribución, es posible que queden más en el fondo de donde se cogen siempre las AuNPs, con lo que al final la absorbancia puede ir disminuyendo, como ocurre en este caso.

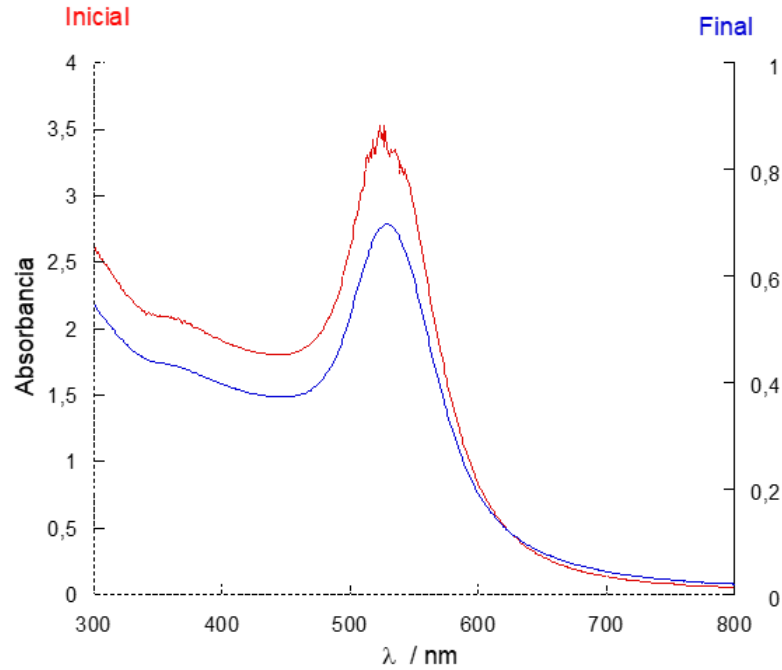


Figura 23: Comparación de los dos espectros de absorción de las AuNPs al inicio de los experimentos y al final (transcurridos 7 meses entre uno y otro). Se comprueba que las λ_{max} de cada uno están en los 528 nm. Confirmando así que el plasmón no se ha desplazado y que las nanopartículas son muy estables.

Las AuNPs no se han agregado lo que quiere decir que tiene mucha estabilidad, lo único que ha cambiado ha sido la absorbancia. Si la absorbancia disminuye es porque la concentración en suspensión también lo hace debido a que algunas AuNPs se quedan pegadas al recipiente que las contienen, dejando de contribuir en la absorbancia que se mide.

3.2. Imágenes TEM

A continuación, en las Tablas 2 y 3, se presenta un resumen de las distintas síntesis llevadas a cabo durante el trabajo. Están numeradas por orden cronológico. Se indica de izquierda a derecha: número de síntesis, tipo de liposoma empleado, la concentración de lípido, agua y oro utilizada, el tipo de ultrasonido que se ha usado (baño o sonicador en punta), mezclas empleadas en las muestras para el TEM y finalmente el tamaño medio de los liposomas. En todas las síntesis se han empleado 20 minutos de hidratación en el horno de hibridación y 2 minutos de agitación en vórtex.

N	Síntesis	Concentración	Punta	Baño us	Preparación TEM	Tamaño/nm
1	Lipo-N	100 mg lípido + 500 μ L AuNPs + 1.5 mL H ₂ O	3p 2s 30 %		200 μ L síntesis + 800 μ L H ₂ O	600 \pm 200
					5 μ L síntesis + 95 H ₂ O	310 \pm 160
2	Lipo-Cat	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 %		200 μ L síntesis + 800 μ L H ₂ O + 500 μ L AuNPs	300 \pm 100
					1 μ L síntesis + 200 μ L AuNPs	290 \pm 150
					5 μ L síntesis + 200 μ L AuNPs (sonicado durante mezcla)	315 \pm 100
					5 μ L síntesis + 200 μ L AuNPs (sonicado después de la mezcla)	315 \pm 100
					25 μ L síntesis + 200 μ L AuNPs	330 \pm 100
3	Lipo-Cat	100 mg lípido + 2 mL AuNPs	3p 2s 30 %		200 μ L síntesis + 1 ml AuNPs (sonicado durante mezcla)	Fallo
					200 μ L síntesis + 1 ml AuNPs (sonicado después mezcla)	Fallo
					200 μ L síntesis + 1 ml AuNPs (no sonicado)	Fallo
4	Lipo-N	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 %			350 \pm 130
5	Lipo-N	10 μ L (100 mg lípido + 2 mL H ₂ O) + 0.8 mL AuNPs	3p 2s 30 %		síntesis	400 \pm 300
					síntesis (07/05/2019)	350 \pm 130
6	Lipo-Cat	100 mg lípido + 2 mL AuNPs	3p 2s 30 %		1 μ L síntesis + 200 μ L AuNPs	270 \pm 90
7	Lipo-Cat 1	30 mg lípido + 1200 μ L AuNPs		50'	síntesis	Fallo
8	Lipo-Cat 2	30 mg lípido + 1200 μ L AuNPs	6p 5s 30 %	50'	100 μ L (síntesis) + 900 μ L H ₂ O	fallo
9	Lipo-N 1	30 mg lípido + 1200 μ L AuNPs	6p 5s 30 %	50'	100 μ L (síntesis) + 900 μ L H ₂ O	130 \pm 50
10	Lipo-N 2	30 mg lípido + 1200 μ L AuNPs	6p 5s 30 %	50'	100 μ L (síntesis) + 900 μ L H ₂ O	170 \pm 50

Tabla 2: Se presentan distintas síntesis llevadas a cabo durante el trabajo.

N	Síntesis	Concentración	Punta	Baño us	Preparación TEM	Tamaño/nm
11	Lipo-N-SH 1 diluído	50 mg lípido + 2000 μ L AuNPs 100 μ L (Lipo-N-SH 1) + 900 μ L H ₂ O	3p 2s 30 %	30'	síntesis síntesis	240 \pm 90 1000 \pm 500
12	Lipo-N-SH 2 diluído	50 mg lípido + 2000 μ L AuNPs 100 μ L (Lipo-N-SH 2) + 900 μ L H ₂ O	3p 2s 30 %	30'	síntesis síntesis	600 \pm 300 500 \pm 200
13	Lipo-N-SH 1	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 % 3p 2s 30 %	30' 30'	10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs 10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs	1100 \pm 600 800 \pm 300 280 \pm 100
14	Lipo-N-SH 2	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 % 3p 2s 30 %	30' 30'	10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs 10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs	500 \pm 300 800 \pm 500 280 \pm 100
15	Lipo-Cat 1	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 %	30' 30'	10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs 10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs	700 \pm 300 700 \pm 400
16	Lipo-Cat 2	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O	3p 2s 30 %	30' 30'	10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs 10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs	340 \pm 100 630 \pm 500
17	Lipo-N-SH	100 mg lípido + 2 mL H ₂ O		30'	10 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs 5 μ L síntesis + 400 μ L AuNPs	

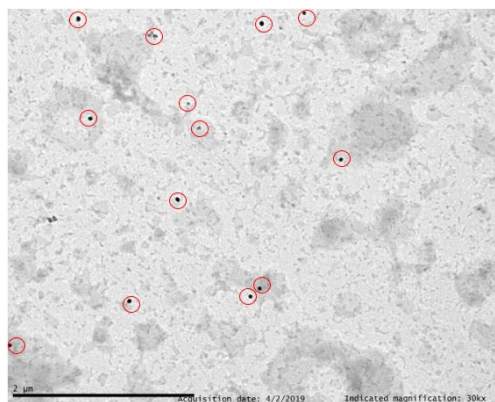
Tabla 3: Se presentan distintas síntesis llevadas a cabo durante el trabajo.

Por otro lado, se muestran distintas imágenes obtenidas por TEM de las anteriores síntesis nombradas en las Tablas 2 y 3.

En la Figura 24 se muestran dos imágenes TEM de la síntesis de Lipo-N donde se puede observar una gran cantidad de lípido en comparación con las AuNPs empleadas, pocas AuNPs se adhieren a la superficie externa de los liposomas y se encuentran muy dispersas. Se han resaltado con pequeñas circunferencias en color rojo. En la Figura 24 (a) se ve resaltado con una circunferencia grande negra que rodea el liposoma y con dos pequeñas las NPs que están adheridas a él. Durante todas las observaciones nos fijaremos en algo parecido a esto, un círculo que es más oscuro que el fondo y las NPs que lo rodean. A veces cuesta diferenciarlos y otras veces, como en este caso, se ve a simple vista.



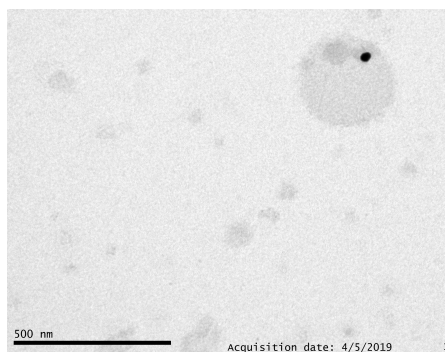
(a) 1.Lipo-N (200-800). La barra de escala es de 1 μm .



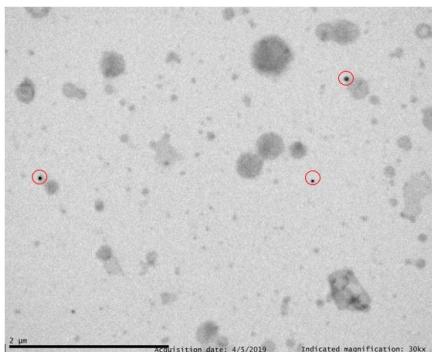
(b) General 1.Lipo-N (200-800). La barra de escala es de 2 μm .

Figura 24: 1.Lipo-N: 200 μL de Lipo-N con AuNPs disueltos en 800 μL de H_2O .

En la Figura 25 se muestran imágenes de la síntesis de Lipo-N que se realizó con una concentración en la que se rebajó la cantidad del lípido en comparación al oro. Se pueden apreciar más AuNPs aunque siguen muy dispersas sin adherirse a los liposomas.



(a) 1.Lipo-N (5-95). La barra de escala es de 500 nm.

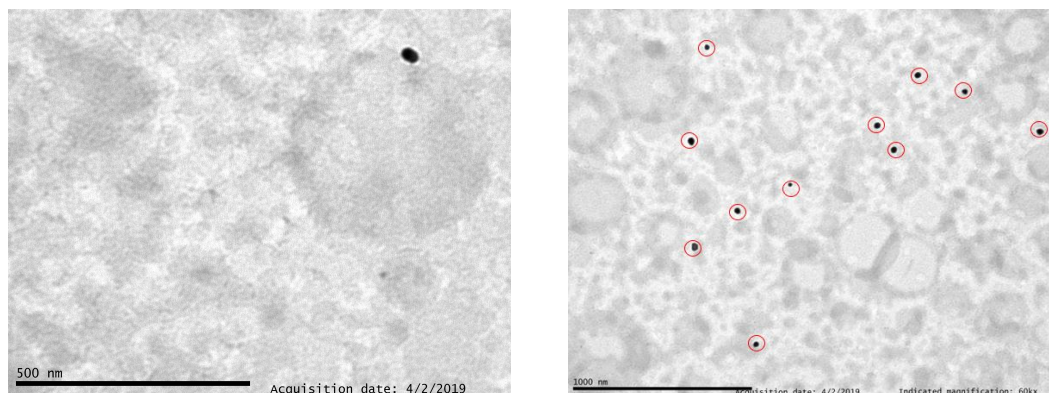


(b) General 1.Lipo-N (5-95). La barra de escala es de 2 μm .

Figura 25: 1.Lipo-N 5-95: 5 μL de Lipo-N con AuNPs disueltos en 95 μL de H_2O .

En la síntesis de los Lipo-Cat (Figura 26) se observa como muchos liposomas tienen varias

AuNPs pegadas a su superficie. Con lo que se realizó otra síntesis variando las concentraciones para que hubiera más AuNPs en la superficie (Figura 27).



(a) 2.Lipo-Cat (primera). La barra de escala es de 500 nm.

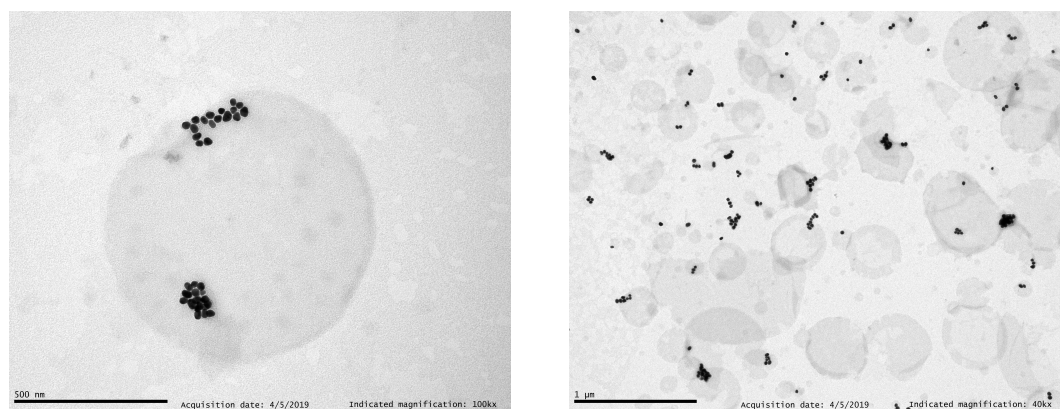
(b) General 2.Lipo-Cat (primera). La barra de escala es de 1 μ m.

Figura 26: 2.Lipo-Cat: 200 μ L de Lipo-Cat + 800 μ L de H₂O + 500 μ L de AuNPs.

Estas imágenes indican que la concentración de AuNPs empleada fue muy pequeña.

Durante todos los experimentos se han ido obteniendo imágenes mediante TEM como las anteriores. A continuación se muestra algunas de las mejores obtenidas:

Para la concentración de 1 a 200, siendo 1 μ L de síntesis de liposoma y 200 μ L de AuNPs se observa una gran mejora. Como se quería en la anterior síntesis, hay muchas más AuNPs por liposoma y en la Figura 27 (a) hay una gran cantidad de ellas adheridas a la superficie. En este caso, los liposomas no se diluyeron con agua. Los lípidos parecen afectar a la dispersión de las AuNPs que están agregadas.



(a) 2.Lipo-Cat (1-200). La barra de escala es de 500 nm.

(b) General 2.Lipo-Cat (1-200). La barra de escala es de 1 μ m.

Figura 27: 2.Lipo-Cat 1-200: 1 μ L de Lipo-Cat + 200 μ L de AuNPs.

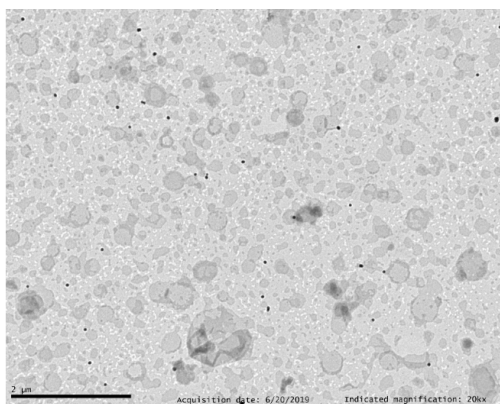
Se observa que a mayor concentración de liposomas, estos no se separan y se agregan entre sí.

Quitando la prueba realizada con la concentración oro-lípido de 1-200 μL , ningún resultado es cercano a lo que se espera (distribución homogénea de AuNPs alrededor de los liposomas) por lo que se realizaron nuevos experimentos con esta concentración pero variando la forma de combinar los lípidos con las AuNPs. La unión de liposoma y AuNP se realizó de dos formas distintas: 1) se introduce el lípido en un recipiente y mientras se sonica con el baño de ultrasonidos se introducen las AuNPs y 2) se sonica el lípido por un lado, y las AuNPs por otro y después, fuera del baño de ultrasonidos se juntan.

Para la segunda forma se observó que la mezcla, que era de color rosa-rojizo, se transformó en una mezcla de color azul, esto indica que se produce agregación y por ello se siguió haciendo solo el primer método.

Cabe destacar que aunque en muchas de las pruebas realizadas se vieron resultados aceptables, en otros, los liposomas no se formaban o se rompían después de la sonicación. Lo que permitió ir guiando el camino para obtener el mejor procedimiento de síntesis. En algunos casos se realizó la sonicación en punta, descartada desde el primer resultado, ya que rompía por completo los liposomas y solo se observaban finas capas de grasa en las rejillas.

En la Figura 28 se muestra una imagen general de lo que se observaba en las síntesis de los lipo-N con AuNPs.

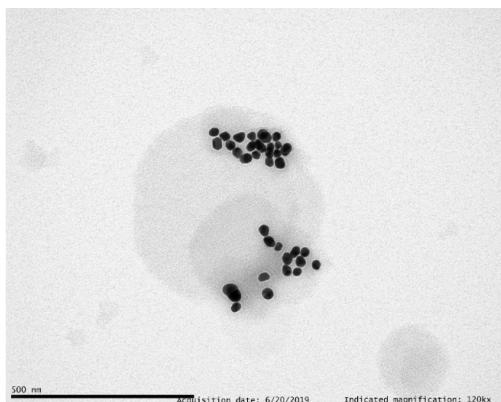


(a) 9.LipoN. La barra de escala es de 2 μm .

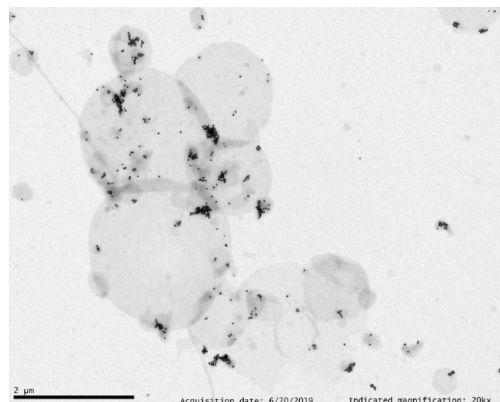
Figura 28: Lipo-N. Imagen característica que representa a las dos síntesis (9 y 10 en la tabla 2).

Salvo algunas excepciones, todas las síntesis de Lipo-N con AuNPs formaban bien los liposomas, de buen tamaño, pero tras los distintos métodos empleados para incorporar las AuNPs (sonicación en punta con distintas potencias, sonicación en baño de 30 minutos y variando las concentraciones oro-lípido) el oro siempre estaba muy disperso y no se adhería bien a los liposomas. Por esta razón se intentó probar con los Lipo-NSH dado que los grupos tioles que tienen estos liposomas en superficie atraerían con fuerza a las AuNPs y se conseguiría su unión. Esto se puede ver en las Figuras 29, 30 y 31. Con este nuevo lípido se vio el resultado esperado, había muchas más AuNPs adheridas a la superficie de los liposomas como por ejemplo en Figura 29 (a).

En la Figura 29 se puede observar uno de los resultados correspondiente a la síntesis de



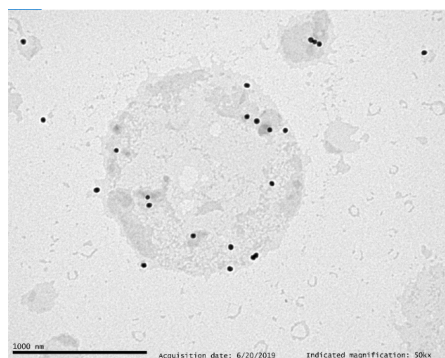
(a) 11.Lipo-N-SH (baño). La barra de escala es de 500 nm.



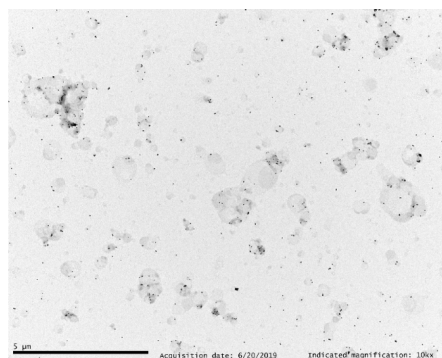
(b) General 11.Lipo-N-SH (baño). La barra de escala es de 2 μm .

Figura 29: Lipo-NSH (en la tabla 3 corresponde al 11).

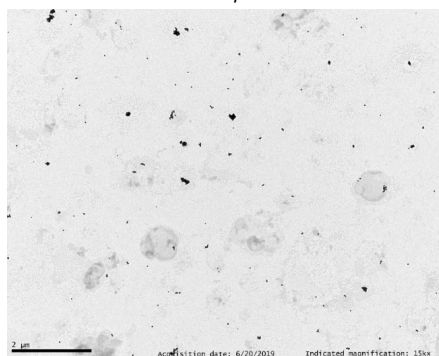
Lipo-N-SH. Los liposomas se forman perfectamente y las AuNPs se adhieren al liposoma con gran facilidad. En todos los liposomas se observa una gran cantidad de AuNPs.



(a) 13.Lipo-N-SH (punta-baño). La barra de escala es de 1 μm .



(b) General 13.Lipo-N-SH (punta-baño). La barra de escala es de 5 μm .

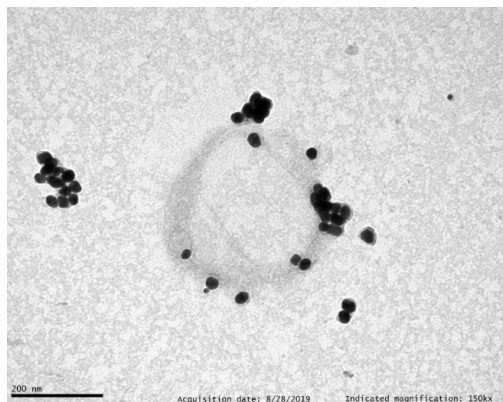


(c) General 14.Lipo-N-SH (punta-baño). La barra de escala es de 2 μm .

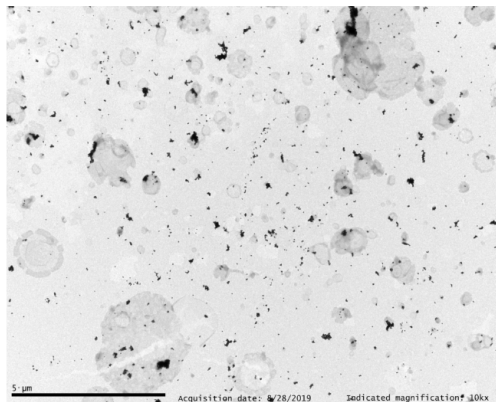
Figura 30: Lipo-NSH (en la tabla corresponden a 13 y 14).

En la Figura 30 se observa otra síntesis de Lipo-N-SH, esta vez empleando los dos métodos

de sonicación para ver si en este caso la sonicación en punta afectaba a la formación de los liposomas. Se puede apreciar que hay algunos liposomas rotos y otros bien formados, la rotura de los liposomas no fue tan exagerada como cuando se hizo con los anteriores lípidos, pero preferimos seguir realizando las síntesis solo con baño ya que los resultados fueron mejores.



(a) 17.Lipo-N-SH. La barra de escala es de 200 nm.



(b) General 17.Lipo-N-SH. La barra de escala es de 5 μm

Figura 31: Lipo-N-SH (en la tabla corresponde a la síntesis número 17). Vista general y un liposoma específico.

Por último, en la Figura 31 se observa otra síntesis de Lipo-N-SH. Se puede ver que como en las anteriores, los liposomas se formaron y las AuNPs se adherían a la perfección. Dado que en esta síntesis se probó con menos lípido en comparación con el oro, se puede observar que hay más AuNPs por liposoma que en las anteriores.

3.3. Caracterización de liposomas

Se han realizado distintas síntesis de liposomas con las nanopartículas de oro utilizando los 3 tipos de liposomas: Lipo-N, Lipo-Cat y Lipo-N-SH.

En el caso de los liposomas, dado que se han realizado distintas síntesis, en las Tablas 2 y 3 se recoge toda la información relevante de cada una de ellas, proporciones de la mezcla, tiempo en el baño de ultrasonido o sonicador en punta, tamaño medio de los liposomas,...

Además se han medido los espectros de absorción de los liposomas y de los liposomas junto a las AuNPs. La absorción de los liposomas es muy pequeña (Figura 32), la principal contribución se debe a la dispersión Rayleigh debido a que su tamaño es del orden de la longitud de onda de la luz incidente y da lugar a la aparición de un fondo de dispersión (turbidez). Esto da cuenta de lo poco que interfieren los liposomas con las nanopartículas en la absorción.

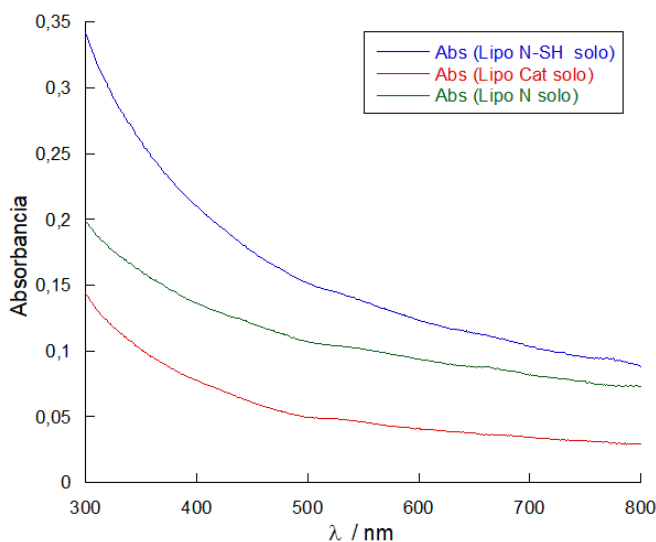


Figura 32: Espectros de absorbancia de síntesis realizadas de los distintos liposomas.

Por otra parte se han medido los espectros de absorción de los distintos liposomas junto con las AuNPs. El primer resultado a tener en cuenta es el desplazamiento de la RPS que indica que los Lipo-Cat hacen que las nanopartículas de oro se agreguen y por eso el máximo de la absorción se ha desplazado hacia el rojo. Esto concuerda con el tono azulado que adquieren la mezcla al añadir los liposomas a las AuNPs (Figura 33) aunque una pequeña parte sigue sin agregarse como se puede ver en el pico que permanece en la longitud de onda de resonancia del plasmón. El efecto de agregación también se observó claramente en las imágenes TEM.

En la Figura 34 se muestran los espectros de absorción de las AuNPs con liposomas donde la síntesis se ha realizado por separado a la unión del lípido con el oro, es decir, se han sintetizado por una parte los liposomas y por la otra la síntesis de las AuNPs juntándolas posteriormente. Mientras que en la Figura 35 la formación de los liposomas se ha realizado con las AuNPs en el medio acuoso.

No se observa ninguna influencia en el uso de un proceso u otro en cuanto a la agregación de

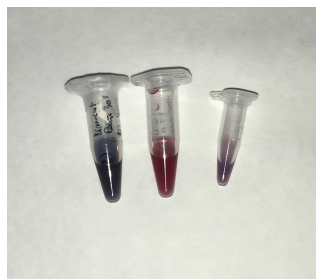


Figura 33: De izquierda a derecha: Lipo-Cat, Lipo-N y Lipo-NSH.

las NPs. Sin embargo, sí se aprecia un aumento de la absorbancia en el caso de los Lipo-N cuando la unión a las AuNPs es posterior a la síntesis de los liposomas, indicando que la captura de AuNPs es más eficiente

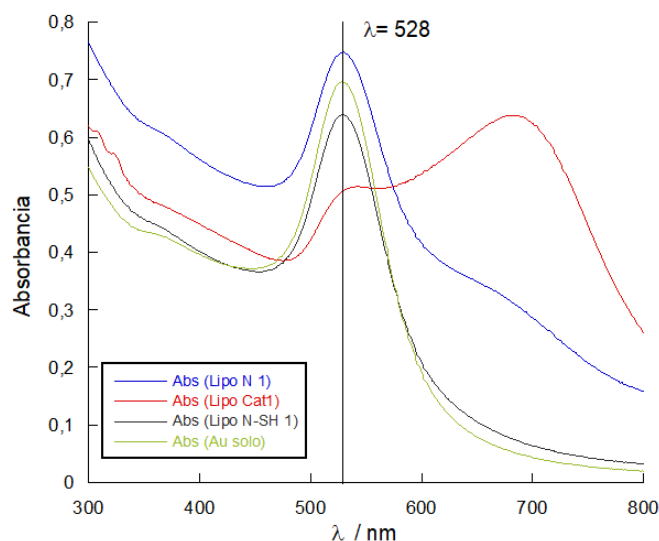


Figura 34: Espectro de absorción de los tres tipos de liposomas y su posterior unión a las AuNPs.

Respecto a la Figura 34 se puede decir que en el caso de los Lipo-N-SH no hay agregación ya que el pico de absorbancia (RPS) no se ha desplazado, es el mismo que en el espectro de absorción de las NPs solas; en los Lipo-Cat se aprecia una gran agregación, se puede ver un pico pronunciado en el mismo sitio que las AuNPs y además una banda desplazada hacia mayores longitudes de onda, esto se conoce como *red-shift* y ocurre porque las partículas se han agregado y son mayores, por lo que induce un desplazamiento al rojo del plasmón; por último, en los Lipo-N, prácticamente no hay agregación, se ve un pequeño hombro en el espectro que lo indica.

Por otro lado, en la Figura 35 se muestran unos espectros similares pero en el caso de los Lipo-N la absorbancia es mucho mayor. Esto puede ser debido a que haya más AuNPs que estén en el interior de los liposomas y están más juntas entre sí que en el caso anterior por lo que estas partículas ahora son mayores y están más concentradas. Aunque la absorbancia sea mayor, el dato que nos importa es que la RPS se encuentra en el mismo pico y por ello se

vuelve a confirmar la estabilidad de las síntesis y que los liposomas no afectan a las AuNPs.

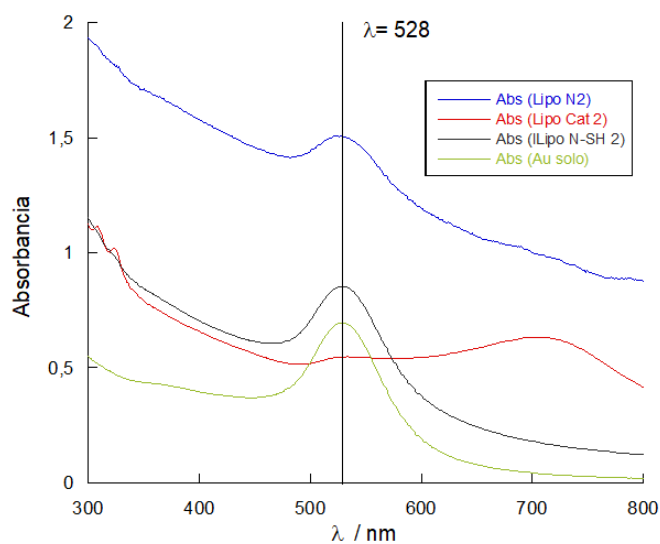


Figura 35: Espectro de absorción de los tres tipos de liposomas en los que se ha realizado la síntesis con AuNPs en el interior.

4. Conclusiones

Se ha realizado la síntesis de nanopartículas de oro mediante el método de Turkevich para su posterior uso en la funcionalización o encapsulación mediante distintos liposomas para probar la eficacia de estos como nano-transportadores en terapias.

Estas partículas se han caracterizado mediante TEM y espectroscopía UV-Vis. Se pudo apreciar que son cuasi-esféricas, que el diámetro medio está en torno a los 30 nm y su monodispersidad.

A la hora de sonicar, si se emplea la sonicación en punta, esto rompe los lipo-Cat y hace más pequeños los lipo-N por lo que es mejor emplear una sonicación en baño de un mínimo de 30 minutos y no emplear esta técnica si se quieren emplear liposomas de $d \geq 200$ nm.

Se ha observado que la longitud de onda del máximo de la absorbancia no se ha desplazado respecto al espectro de las AuNPs solas, confirmando la estabilidad que tiene la funcionalización realizada de las AuNPs con los liposomas.

El uso del TEM no nos permite saber de manera inequívoca si las AuNPs se quedan en el interior, en la membrana o en la superficie. Para ello se debería emplear otra técnica como es el crio-TEM.

Se concluye que las síntesis que han dado los mejores resultados son los siguientes:

Se hace uso del horno de hibridación de noria durante 20 minutos a 55°C para proceder a la hidratación, el vórtex durante 2 minutos y el baño de ultra sonido de un mínimo de 30 minutos (no se aprecian diferencias entre 30 minutos y 1 hora de baño).

Es en el momento de la incorporación de las AuNPs, de su dilución y de las concentraciones en lo que difieren la funcionalización de los tres liposomas.

Hay dos partes fundamentales en la diferenciación: 1) Realizar la síntesis de los liposomas negativos junto con las AuNPs y la de los liposomas positivos separada de las AuNPs y 2) las concentraciones de la muestra entre lípido y oro son distintas para los distintos liposomas (obteniendo la concentración más adecuada para cada una de ellas en base a la observación de distintas síntesis y los resultados en el TEM).

A continuación se muestra los experimentos que mejor funcionalizan los liposomas:

- Para los Lipo-Cat se sintetiza el lípido primero y después se junta con las AuNPs. Se ha observado que la síntesis con mejores resultados es la siguiente:
Se hidratan 100 mg de lípido con 2 mL de H₂O y de esta preparación se coge una proporción de 1 a 200 μ L de lípido a oro, respectivamente.
Con estos pasos se consiguen liposomas de $d \approx 500 \pm 100$ nm en los que se adhieren las AuNPs.
Dado que el Lipo-Cat es catiónico, esto permitiría un mejor transporte de medicamentos que tengan cargas negativas.
- Para los Lipo-N no se ha conseguido una buena funcionalización con las AuNPs alrededor de los liposomas. Debido a que tienen la misma carga (negativa) que las AuNPs, las

repulsiones son fuertes y las AuNPs se separan mucho de los liposomas y no se quedan pegadas a ellos. En contadas ocasiones, alguna AuNP se queda encapsulada o adherida al liposoma. Se ha intentado mediante distintos métodos y no se han obtenido buenos resultados como para dar el experimento por válido.

- Para los Lipo-N-SH se ha empleado la misma síntesis que con los Lipo-Cat, esperando obtener los mismos resultados ya que el oro tiene gran afinidad por los grupos tioles y se adhieren fácilmente. Se ha podido comprobar que incluso hay mejores resultados que con los Lipo-Cat ya que se aprecian más AuNPs que rodean el liposoma.

Las mejores concentraciones en este caso son las siguientes:

Se hidratan 100 mg de lípido con 2 mL de H₂O y de esto se usa una proporción 10 a 400 μ L de lípido a oro, respectivamente.

Dado que el Lipo-N-SH es aniónico, esto permite un mejor transporte de medicamentos que tengan cargas positivas.

Se puede concluir de esta forma que se han obtenido dos buenos resultados:

Lipo-Cat que tiene su superficie cargada positivamente y el Lipo-N-SH que tiene su superficie cargada negativamente, pero con una modificación, conteniendo grupos tiol que tienen mucha afinidad por el oro, adecuados para un buen transporte de NPs con distintas características. Para el caso de los Lipo-N, como se ha mencionado antes, no se ha conseguido una distribución homogénea de las AuNPs alrededor de los liposomas.

Por otro lado, gracias a la estabilidad que tienen las AuNPs, también se pueden emplear para inducir calentamiento por luz (fototermia).

Referencias

- [1] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot and A. Plech. “*Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited*”, J. Phys. Chem. B, n°110, págs. 15700-15707, (2006).
- [2] E.Reimhult. “*Nanoparticle-triggered release from lipid membrane vesicles*”, New Bio-technology, vol. 32, n°6, págs. 665 -672, (2015). doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.12.002>.
- [3] N. Lafuente, “*Nanopartículas estímulo-respuesta para la liberación de fármacos (TFG)*”, (2017)
- [4] W. Bawarski, E. Chidlowsky, D. Bharali and S. Mousa, “*Emerging nanopharmaceuticals*”, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 4, n°4, págs. 273 -282, (2008) doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.06.002>.
- [5] M. Moddarese, M. Brown, Y. Zhao, S. Tamburic and S. Jones, “*The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery*”, International Journal of Pharmaceutics, vol. 400, n°1, págs. 176 -182, (2010) doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.012>.
- [6] L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere and P. Speiser, “*Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier*”, International Journal of Pharmaceutics, vol. 15, n° 3, págs. 335 -345, (1983) doi:[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90166-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90166-7)
- [7] R. Oropesa y U. Jáuregui, “*Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas*”, vol. 43, n° 3, (2012)
- [8] G. Bozzuto y A. Molinari, “*Liposomes as nanomedical devices*”, Dovepress, págs. 975-999, (2015)
- [9] J. Díaz, “*Análisis de productos cosméticos mediante técnicas nanoscópicas (SPM)*”, Revista NCP. Sociedad española de químicos y cosméticos, vol. NCP, (2011)
- [10] L. Euliss, J. DuPont, S. Gratton and J. DeSimone, “*Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine.*”, Chem Soc Rev, n° 35, 1095–1104, (2006)
- [11] D. D. Lasic, “*Liposomes from physics to applications*”, Elsevier, págs. 9-40, (1993)
- [12] T. Fahmy, P. Fong, J. Park, T. Constable and M. Saltzman, “*Nanosystems for simultaneous imaging and drug delivery to T cells*”, Springer-Verlag, vol. 9, E171-80, (2007), doi:10.1208/aapsj0902019.
- [13] EN Nanovex Biotechnologies SL, Nanovex Biotechnologies. Nanovesicles and Nanoparticles, (2019). dirección: <http://www.nanovexbiotech.com/>
- [14] S. Al-Qadi y R. López, “*Nanopartículas metálicas: oro*”, págs. 223-248, (2009)

- [15] E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. Murphy and M. Wyatt, “*Gold Nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*”, *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), vol. 1, págs. 325-7, (2005). doi:10.1002/smll.200400093
- [16] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin and C. Kiely, “*Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles*”, *J. Chem. Soc.*, págs. 1655-1656, (1995). doi:10.1039/C39950001655
- [17] M. Pérez, “*Estudio del mecanismo molecular de apoptosis y de la seguridad de la terapia fototérmica aplicada al tratamiento del cáncer utilizando nanoprismas de oro funcionalizados*”, Tesis doct., Universidad de Zaragoza, (2016).
- [18] E. Dreaden, A. Alkilany, X. Huang, C. Murphy y M. El-Sayed, “*The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine.*”, *Chemical Society reviews*, (2012).
- [19] Z. Qina y J. Bischof, “*Thermophysical and Biological Responses of Gold Nanoparticle Laser Heating*”, *Chemical Society reviews*, vol. 41, págs. 1191-217, (2011). doi:10.1039/c1cs15184c
- [20] CY Lai, D. Kruse, C. Caske, D. Stephens, P. Sutcliffe y K. Ferrara, “*Noninvasive thermometry assisted by a dual-function ultrasound transducer for mild hyperthermia.*”, págs. 2671-2684, (2010). doi:10.1109/TUFFC.2010.1741.
- [21] G. Baffou, C. Girard y R. Quidant, “*Mapping Heat Origin in Plasmonic Structures*”, *Physical review letters*, vol. 104, (2010). doi:10.1103/PhysRevLett.104.136805
- [22] E. Dreaden, M. Mackey, X. Huang, B. Kang y M. El-Sayed, “*Beating cancer in multiple ways using nanogold*”, *Chemical Society reviews*, (2011). doi:10.1039/c0cs00180e.
- [23] A. Tabero, X. Weng, A. Martínez y P. Acedo, “*Nanoterapias en el campo de la Biomedicina*”, *Nanomedicina*, n°192, págs. 24-29, (2017)
- [24] L. Lechuga, “*Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud*”, (2011)
- [25] R. F. Egerton, “*Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM and AEM*”, New York: Springer, (2007).
- [26] N. Khlebtsov, “*Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra*”, *Analytical Chemistry*, vol. 80, n°17, págs. 6620-6625, (2008). doi:10.1021/ac800834n
- [27] L. Cornejo, “*Resonancia del plasmón de la superficie (RPS); propiedades optoelectrónicas*”, (2015). dirección: <http://nuevastecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>